Paris 1972

FACULTÉ DE MÉDECINE XAVIER-BICHAT

année 1972 N°

65

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(diplome d'état)

par

ségolaine marie AYMÉ épouse ABOULKER

née le 7 fevrier 1946 à Paris XVI

présentee et soutenue publiquement le 1972

CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA LEUCOENCEPHALITE SCLEROSANTE SUBAIGUE

Président : Monsieur R. BASTIN, professeur

FACULTÉ DE MÉDECINE XAVIER-BICHAT

nnée 1972 N°

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(diplome d'état)

par

ségolaine marie AYMÉ épouse ABOULKER

née le 7 fevrier 1946 à Paris XVI

présentee et soutenue publiquement le 1972

CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA LEUCOENCEPHALITE SCLEROSANTE SUBAIGUE

Président : Monsieur R. BASTIN, professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Nous remercions

Monsieur le Professeur R. BASTIN

Médecin de l'Hôpital Claude Bernard à PARIS

de nous avoir fait l'honneur d'accepter la

présidence de cette thèse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547103_0033

Nous remercions Monsieur le Professeur agrégé C. CHANY,
Chef du service de Microbiologie de l'Hôpital Saint-Vincent de Paul
à PARIS
de nous avoir permis d'effectuer ce travail dans son service.

Que Monsieur le Docteur V. TER MEULEN
Département de Virologie
Université de WURZBURG, Allemagne

Monsieur le Docteur H. KOPROWSKI
Wistar Institute
PHILADELPHIE, U.S.A.

et Monsieur le Docteur G. BARBANTI-BROIANO
Institut de Microbiologie
BOLOGNE, Italie

trouvent ici l'expression de notre reconnaissance pour les conseils
et les encouragements qu'ils nous ont prodigués avec compétence et
gentillesse.

Nous sommes reconnaissantes à

Monsieur le Professeur C. HANNOUN,

Chef de service de l'unité d'Ecologie virale

Institut Pasteur, PARIS

de nous avoir permis d'écrire cette thèse pendant notre séjour dans son service, et de nous avoir donné la possibilité d'assister au Ier Congrès Européen de Virologie qui nous a beaucoup appris.

Notre reconnaissance va aussi à

Monsieur le Docteur J.C. TURPIN

qui nous a fourni les sérums et liquides cephalo-rachidiens de malades

et à Monsieur le Docteur P. LEBON

qui a collaboré à ce travail.

Liliane MOREAU

Elly EFTHYMIOU

Jacqueline LOPEZ

Brigitte GALLIOT

Marie-Claude MOREAU

Nicole MOREAU

Nicole RENARD

nous ont tout enseigné des techniques virologiques et souvent aidé à manipuler.

Qu'elles trouvent ici l'expression de notre gratitude et le signe de notre amitié.

SOMMAIRE

Chap. I. Introduction

Chap. II. La rougeole

I) la maladie clinique

2) les complications neurologiques de la rougeole

3) le virus de la rougeole

a) structure

b) propriétés physiques

c) culture

d) sérologie

e) hôtes

Chap. III. La Leucoencéphalite sclérosante subaigue

I) la maladie clinique

2) l'anatomo-pathologie

3) mise en évidence d'un antigène de rougeole

4) les signes biologiques et la sérologie

5) LESS et vaccination

Chap. IV. Etiologie et pathogénie

I) Isolement d'un paramyxovirus des cellules cérébrales

2) Etude des caractéristiques du virus isolé

a) propriétés biologiques

b) étude structurale approfondie

3) Isolement d'autres tissus que le tissu cérébral

a) à partir des ganglions lymphatiques

b) tentative d'isolement à partir du sang périphérique

c) étude du caryotype des leucocytes de malades

4) Isolement d'un second virus

5) Etude de l'état immunitaire des malades atteints de LESS

6) Recherche d'un effet interféron dans le LCR de malades

7) Recherche d'anticorps anti-interféron dans le serum de malades

8) La maladie expérimentale

9) Hypothèses pathogéniques

Chap. V. Conclusion

Chapitre I

INTRODUCTION

La Leucoencéphalite sclérosante subaigue (LESS) est une maladie neurologique de l'enfant d'évolution progressive. Elle a été séparée pour la première fois dans la vaste classe des encéphalites d'étiologie inconnue par Dawson en 1933 (1). Celui-ci montra, chez les malades, l'existence de corps d'inclusions éosinophiles intranucléaires et intracytoplasmiques dans les neurones et les cellules gliales. La maladie porta alors le nom d' "Encéphalite à inclusions".

Quelques années plus tard, Van Bogaert et Busscher (2) décrivaient plusieurs cas présentant le même aspect anatomo-clinique que l'encéphalite de Dawson, mais sans inclusions, caractérisés par une démyélinisation et une sclérose de la substance blanche. On sait maintenant que les inclusions peuvent ne pas être visibles à certaines étapes de la maladie et dans certaines localisations (3). La magistrale description anatomoclinique de Van Bogaert donnait à la maladie son nom définitif de "encéphalite sclérosante subaigue".

Dès 1948 les signes électroencéphalographiques de la maladie furent reconnus comme assez caractéristiques pour autoriser le diagnistic (4).

En 1965 une étude ultrastructurale due à Bouteille (5) montra l'existence de structures virales dans le cerveau d'une malade, structures rappelant le virus de la Rougeole.

Pendant toute cette période et jusqu'en 1968, toutes les tentatives pour isoler le virus dont on soupçonnait l'existence se soldèrent par des échecs.

En 1967, la preuve (6) de l'identité antigénique des structures virales vues en microscopie électronique et du virus de la rougeole fut apportée par les techniques d'immunofluorescence. Peu de temps après, deux équipes isolaient

le virus par des techniques différentes.

Dès lors les travaux se multiplièrent dans l'espoir d'élucider la pathogénèse de cette maladie, et de trouver, par là-même, un modèle explicatif de la pathologie nerveuse d'étiologie virale.

La LESS est une maladie singulière à bien des égards, puisqu'il s'agit d'une maladie virale survenant plusieurs années après une primo-infection morbilleuse connue pour induire une immunité solide; singulière puisque le virus présent dans les cellules cérébrales n'est pas isolable par les techniques habituelles mais nécessite, pour retrouver sa virulence, des cocultures.

Dans cette étude ,nous avons tenté une mise au point des connaissances actuelles. Au travail bibliographique s'ajoutent quelques résultats personnels.

De tous ces résultats se dégagent plusieurs hypothèses pathologéniques que nous discutons.

Chapitre II

LA ROUGEOLE

I. LA MALADIE CLINIQUE

La rougeole est une maladie virale, éminemment contagieuse, endémo-épidémique. Plus de 90% des adultes sont porteurs d'anticorps antimorbilleux attestant d'une primoinfection ayant donné lieu à maladie clinique dans la plupart des cas, silencieuse parfois (8%). La rougeole touche essentiellement l'enfant, la transmission se faisant directement par voie aérienne.

Le seul hôte naturel actuellement connu, en dehors de l'espèce humaine, est le singe, mais l'infection spontanée de cet animal n'est pas réalisée dans les conditions naturelles d'habitat et c'est après leur capture que les singes sont infectés (7).

Maladie grave dans les pays pauvres, elle est devenue relativement bénigne dans les pays industrialisés, la mortalité étant inférieure à 0,02%.

La forme commune est la plus fréquente.

Après une incubation silencieuse de 10 à 11 jours en moyenne, apparaît toute une série de symptômes qui permettent d'affirmer le diagnostic et de prévoir l'apparition de l'éruption : fièvre, catarrhe oculo-nasal et énanthème pathognomonique..

La fièvre est généralement très élevée, accompagnée de malaise et d'abattement donnant l'impression d'une maladie sévère. Les yeux sont rouges, larmoyants, un écoulement nasal d'abord muqueux devient bientôt purulent; la toux dès ce stade ne manque jamais.

Le signe de Koplik permet d'affirmer la rougeole : il apparaît après un à deux jours de fièvre, souvent difficile à voir au début. Il est fait de

petites taches rouge vif, irrégulières, centrées sur un point blanc-bleuâtre brillant.

L'éruption débute de façon remarquablement fixe, 14 jours après le contage. Elle est caractéristique aussi bien par sa topographie que par sa morphologie. C'est une éruption érythémateuse maculopapuleuse en plaques qui débute derrière les oreilles, puis s'étend progressivement à la face, au cou, au tronc, aux membres supérieurs, à l'abdomen, aux membres inférieurs enfin. Elle dure 6 jours, disparaissant dans l'ordre d'arrivée.

La rougeole, maladie générale, peut atteindre tous les organes et y provoquer des lésions d'importance variable; certaines restent asymptômatiques, d'autres peuvent avoir un retentissement clinique: en dehors des manifestations respiratoires communes de la rougeole qui sont constantes, l'atteinte du parenchyme pulmonaire est assez fréquente. Des manifestations électroencéphalographiques sont notées dans 50% des cas (9).

Les complications de la rougeole sont dues soit au virus lui-même, soit à des surinfections bactériennes, soit aux deux facteurs réunis.

Les complications respiratoires et pulmonaires sont les plus fréquentes: rhinite, otite, laryngite, bronchite, pneumonie, bronchopneumonie,,..

Les complications neurologiques, plus rares, sont, elles, souvent sévères.

II. LES COMPLICATIONS NEUROLOGIQUES DE LA ROUGEOLE

Les complications neurologiques aigues survenant au cours ou au décours de la rougeole, comportent des syndromes encéphalitiques, des myélites et des polyradiculonévrites. Il faut y ajouter les atteintes encéphalitiques inapparentes se traduisant par des altérations transitoires de l'électroencéphalogramme.

Les encéphalites de la rougeole sont généralement classées selon des critères anatomiques (10). On distingue :

1°) l'encéphalite aigue toxique, avec, anatomiquement, un cerveau hémorragique, peu d'infiltration cellulaire, pas de démyélinisation, et une petite réaction gliale. Cette encéphalite est mortelle en 24 heures.

2°) l'encéphalite aigue inflammatoire où la mort peut survenir entre le 3ème et le 6ème jour après l'éruption. C'est une encéphalite périveineuse avec d'importantes infiltrations de cellules lympho-plasmocytaires, pas de démyélinisation, mais une réaction micro-gliale..

3°) L'encéphalite subaigue de Wohlwill et Greenfield, mortelle au 10ème jour, est faite d'une démyélinisation périveineuse avec atteinte des cylindraxes, atteinte prédominant dans la substance blanche. C'est la classique leucoencéphalite..

4°) l'encéphalite lente cicatricielle de Walthard, où la mort peut survenir des semaines ou des mois après le début. Elle est caractérisée par une démyélinisation en foyer, pas de réaction inflammatoire, mais des débris granulaires et graisseux avec un début de cicatrisation gliomésenchymateuse.

5°) l'encéphalite séquellaire, de Malaumd, rare, où la mort peut survenir plusieurs années après la rougeole. La première poussée encéphalitique est suivie d'une rémission avec lourdes séquelles, le malade mourant finalement soit d'une reprise évolutive, soit d'une maladie intercurrente. Les lésions anatomiques sont faites de zones de démyélinisation périveineuse et sous-épendymaire, prédominant au niveau du centre ovale, et entourée d'une zone de gliose.

Les encéphalites compliquent la rougeole avec une fréquence de 1 pour 1000, sans que leur apparition soit corrélée à la gravité de l'éruption. Leur symptomatologie est très variable, toujours impressionnante, se modifiant d'heure en heure, pouvant s'améliorer de façon spectaculaire. La mortalité est de l'ordre de 20%, et parmi les 80% de guérison, 40% le sont avec séquelles neurologiques et psychiâtriques (11).

A cette liste des encéphalites dues au virus de la rougeole, il faut maintenant ajouter la leucoencéphalite sclérosante subaigue.

III. LE VIRUS DE LA ROUGEOLE

a) Structure :

C'est un Para myxovirus. En microscopie électronique, son diamètre extérieur est de 1.200 à 2.500 angstroems. Il est entouré d'une membrane de 100 ang. d'épaisseur, d'où partent des projections. Les particules virales partiellement rompues laissent échapper une structure en forme de bâtonnets. Cette structure a un diamètre de 170 à 180 ang. et une lumière centrale de 50 ang. Sa surface extérieure offre des dentelures régulières disposées avec une périodicité d'environ 55 ang.

Le groupe des paramyxovirus comprend, outre le virus de la rougeole, le virus de la peste bovine, le virus de la maladie de Carré et le virus para influenza 3'S.

L'enveloppe du virion est de nature lipoprotéique, les projections radiaires représentant l'hémagglutine du virus.

Le constituant de structure hélicoïdale est de nature nucléoprotéique et représente un antigène soluble du virus; le constituant nucléique est un acide ribonucléique monocaténaire d'un poids moléculaire de 3.000.000 environ.

b) Propriétés physiques :

Le virus est très thermolabile, mais supporte des grandes variations de pH.

c) Culture :

Il se cultive sur cellules de première explantation ou cellules en lignée continue. Pour l'isolement, on utilise essentiellement des cellules rénales d'homme ou de singe; après quoi le virus peut être adapté à un très

grand nombre de lignées cellulaires : HeLa, KB, Hep2, FL, etc... Ce virus peut être également cultivé en suspension de leucocytes humains : il se développe alors essentiellement dans les leucocytes mononucléés.

L'effet cytopathogène qu'il détermine réside dans la formation de cellules géantes par disparition de membranes cellulaires de cellules adjacentes. Les noyaux des cellules fusionnées convergent vers le centre de la masse cytoplasmique.

Deux facteurs distincts interviennent dans la formation de cellules géantes : la réplication du virus et un facteur indépendant de la réplication, appelé facteur de fusion (F.F.). L'activité de ce FF persiste après inactivation du virus par les ultraviolets, mais il n'est pas transmissible. Il est possible que le FF soit l'hémolysine du virus.

La formation de cellules géantes est différente selon qu'elle est induite par le FF ou par la réplication virale [12]. Les cellules géantes induites par le FF n'apparaissent que sur les cultures de cellules humaines, son action est très rapide (1/2 heure), la culture étant entièrement transformée en syncitium en 5 heures.

Au cours de la réplication virale, au contraire, la formation de cellules géantes se fait en plusieurs temps, par recrutements successifs étalés sur plusieurs jours.

Les cellules infectées contiennent également des inclusions intranucléaires et intracytoplasmiques.

Les inclusions intranucléaires sont très caractéristiques. En microscopie électronique, il y a disparition du réseau chromatinien et présence de structures qui, selon l'incidence, sont ponctiformes ou filamenteuses, ayant un arrangement géométrique.

Les inclusions intracytoplasmiques sont volumineuses et nombreuses. Leur structure est identique à celles des inclusions intranucléaires.

Le virus morbilleux se multiplie très peu en culture. La quantité de virus libérée est très faible par rapport à la quantité de virus qui reste dans les cellules.

d) Sérologie :

Lors de l'infection par le virus de la rougeole apparaissent rapidement dans le sérum des anticorps décelables par les réactions de neutralisation de l'effet cytopathogène, inhibition de l'hémagglutination, fixation du complément, précipitation en gel et immunofluorescence.

Ce sont principalement les antigènes de la nucléocapside qui entrent dans la réaction de fixation du complément.

L'hémagglutinine est liée à l'enveloppe virale (13). L'hémolysine de nature protéique est distincte de l'hémagglutinine, mais leurs actions semblent liées. L'hémagglutination est un préliminaire nécessaire à l'hémolyse.

L'immunité acquise est solide et durable. Les anticorps apparaissent 24 à 48 heures après l'éclosion de l'éruption, atteignant un maximum en une à trois semaines, diminuant du 3ème au 6ème mois. Les anticorps neutralisant et inhibant l'hémagglutination restent à des taux décelables la vie durant; tandis que le titre des anticorps fixant le complément peut baisser en dessous du seuil de sensibilité des tests.

e) Hôtes :

En dehors de l'homme, le seul hôte normal est le singe. Outre celui-ci, les animaux de laboratoire que l'on peut utiliser pour reproduire une maladie expérimentale sont le souriceau nouveau-né et le hamster, après adaptation de la souche.

Chapitre III

LA LEUCOENCEPHALITE SCLEROSANTE SUBAIGUE

I. LA MALADIE CLINIQUE

La LESS est une maladie rare, touchant environ un habitant sur un million. Elle atteint en général les enfants entre quatre et douze ans, elle est franchement rare avant quatre ans et après quatorze ans. L'atteinte des garçons est 2 fois 1/2 plus fréquente que celle des filles. Il s'agit le plus souvent de cas isolés, sporadiques, bien que de petits foyers épidémiques soient décrits dans la littérature (14), ou deux cas dans la même famille.

Symptomatologie :

Elle est variable dans ses détails, mais néanmoins assez stéréotypée pour permettre un diagnostic. La maladie évolue en trois phases :

Le début est insidieux, marqué par des troubles mentaux : désintérêt, apathie, terreurs nocturnes, colères, phénomènes délirants ou hallucinatoires, et chute des performances scolaires réalisant le classique tableau d'alexie-agraphie. Des convulsions apparaissent bientôt qui motivent l'examen neurologique..

A la période d'état coexistent quatre éléments majeurs qui rendent le diagnostic évident :

a) une désintégration mentale

b) des décharges motrices à périodicité particulière

c) une hypertonie

d) un EEG caractéristique

a) le tableau mental est fait de régression intellectuelle avec perte de

l'initiative, troubles du langage, troubles apraxiques et agnosiques. Tous ces troubles varient en intensité d'un moment à l'autre. Le malade paraît finalement complètement coupé du monde..

b) Les décharges motrices sont :

- soit des crises d'épilepsie généralisée ou focale

- soit des clonies intéressant les membres, la face, les globes oculaires, localisées ou diffuses à tout le corps et entraînant la chute. Ces clonies sont régulières, selon un rythme de 4 à 12 par minute, sur de longues périodes. Durant une même période de plusieurs jours, le même type de secousses cliniques se répète sur le même rythme; d'une période à l'autre, le siège et l'étendue de ces clonies varient. Ces clonies sont exagérées par les stimulations, elles disparaissent dans le sommeil.

Outre ces secousses brèves, on observe des mouvements plus lents et plus prolongés, désordonnés, et de grande amplitude, rappelant l'hémiballisme : gesticulations compliquées, stéréotypies simulant un geste volontaire. Ces mouvements peuvent se fixer en fin de course, réalisant des attitudes bizarres. Ils se répètent selon une rythmicité relativement fixe.

Des mouvements involontaires encore plus lents peuvent survenir. La composante dystonique y paraît dominante : enroulement du corps, opistotonos, fixation des membres dans des positions non naturelles. Ces mouvements ne participent pas à la réitération rythmique si spéciale à la IESS.

c) l'hypertonie caractérise la phase tardive de la maladie. Elle débute par un membre et se généralise ensuite. Elle peut être symétrique, fixant les membres supérieurs en flexion, les membres inférieurs en extension. Plus souvent asymétrique, elle s'accompagne alors d'une torsion du tronc. Lorsque l'hypertonie devient intense les hypercinésies diminuent puis disparaissent. Le tableau évolue finalement vers la rigidité de décérébration.

Un trismus, un réflexe de préhension manuelle, des automatismes de succion ou de préhension buccale peuvent accompagner de tableau.

Un dérèglement thermique et sudoral, une sialorrhée, une hypertrichose sont fréquents.

Un amaigrissement débute dès la phase initiale de la maladie à une époque où la boulimie est pourtant de règle.

L'ensemble de l'évolution dure de 2 à 22 mois, en moyenne 9 mois. Les formes prolongées sont interrompues de rémissions ou de pauses. Finalement, la maladie aboutit à la mort du fait de la cachexie progressive; ou subitement dans le colapsus ou l'hyperthermie. Quelques cas de guérison avec séquelles neurologiques ont été décrits (15).

d) l'EEG :

le tableau EEG est remarquablement stéréotypé (4) : il se caractérise "par l'apparition périodique, sur un tracé de fond de plus en plus profondément altéré, de complexes d'ondes lentes irrégulières. Ces paroxysmes, constants dans un même tracé, varient dans leur forme d'un tracé à l'autre, de même que l'intervalle qui les sépare. Ils sont par ailleurs dans un rapport temporel évident avec les secousses myocloniques". Ces paroxysmes appelés R se verraient moins souvent sur le tracé des grands enfants ou des adultes. Le tracé EEG prend cet aspect caractéristique dès l'apparition des myoclonies cliniques. Au troisième stade de la maladie, stade de rigidité et de décortication, le tracé se désorganise puis devient plat.

Le diagnostic de LESS peut être posé sans le recours à des explorations biologiques raffinées sur ces seuls signes.

II. L'ANATOMOPATHOLOGIE :

Si une biopsie cérébrale est pratiquée, elle montre des anomalies caractéristiques

a) en microscopie optique : L'examen en microscopie optique d'un fragment de cerveau révèle qu'il s'agit d'une panencéphalite.

L'inflammation de la substance blanche est caractérisée par une abondante infiltration lymphoplasmocytaire, une intense prolifération de la microglie, une organisation gliofibriaire précoce. La démyélinisation est peu importante quoique étendue; elle ne respecte pas les fibres en U souscorticales. L'atteinte de la substance grise est faite d'un périvascularite, d'infiltrats plasmocytaires et d'une atteinte modérée des cellules ganglionnaires.

Les lésions polioclastiques prédominent souvent sur les lobes pariétaux et occipitaux, sur les noyaux médians des thalamus, sur la partie ventrale de la protubérance.

Tout se passe comme si l'atteinte gliale était primitive, l'atteinte neuroaxonale restant secondaire.

La réaction inflammatoire au niveau des méninges est modérée. Les lésions siègent dans la région sous-corticale où elles sont prédominantes et convergent vers l'axe central.

Plus la maladie évolue lentement, plus la démyélinisation et la gliose fibriaire sont importantes et les lésions évolutives réduites.

La lésion principale se voit dans les neurones et dans les cellules de l'oligodendroglie : il s'agit de corps d'inclusion éosinophiles, intranucléaires et intracytoplasmiques.

Le corps d'inclusion intranucléaire est en général gros et unique; les inclusions cytoplasmiques sont de taille, de nombre et de forme variables, pouvant se prolonger dans les dendrites et les axones. Les inclusions sont toujours feulgen négatives. L'inclusion nucléaire se colore au vert de méthylpyronine, colorant de l'ARN, les inclusions du cytoplasme prennent les colorations des protéines.

b) <u>En microscopie électronique</u> :

L'étude ultrastructurale de cellules cérébrales atteintes de LESS a été entreprise sur matériel biopsique ou autopsique [15]. Les coupes, après colo-

ration par l'uranil-plomb révèlent :

1°) Les inclusions

1) Les corps nucléaires sont les plus fréquemment rencontrés. De forme généralement arrondie et de constitution variable, ils peuvent être classés en corps fibrilliaires, corps granulo-fibrillaires et corps granuleux; ils sont observés aussi bien dans les noyaux des neurones que dans ceux des cellules gliales et même dans les noyaux de plasmocytes.

Les corps fibrillaires sont constitués de lamelles concentriquement agencées et d'aspect fibrillaire. Exceptionnellement on note quelques granules en leur centre. Un halo clair les entoure. Ils se situent volontiers au voisinage de la membrane et la chromatine nucléaire peut prendre en regard une disposition marginale. La plupart du temps isolés, ils s'accolent parfois. Leur diamètre total varie entre 0,4 et 0,6 mu.

Les corps granulo-fibrillaires ont une zone centrale granulaire mieux individualisée. Les granules centraux: sont en petit nombre et très osmiophiles..

Les corps granuleux sont les plus rares, ils présentent une zone centrale très dense, osmiophile, composée d'une accumulation de grains de 150 angstroems de diamètre, une zone intermédiaire claire et une zone externe mince, formée de matériel fibrillaire.

2°) Les tubules

Ils se présentent comme des tubes recourbés d'un diamètre oscillant entre 18 et 20 millimus, enchevêtrés de façon irrégulière.

3°) Les faisceaux cristallins.

Ce sont des éléments allongés et effilés, leur aspect général en ligne brisée étant évocateur d'une disposition spatiale en spirale. Leur longueur est de 6 mus, ils sont situés constamment dans les noyauxx des neurones.

4°) Les particules osmiophiles..

Elles sont très fréquentes, intracytoplasmiques et intragliales.

Réactions inflammatoires et dégénératives

Des plasmocytes sont très souvent identifiés au contact des parois vasculaires où les cellules de l'adventice présentent des phénomènes de mytose et de phagocytose. De nombreux prolongements de glie fibrillaire, surchargés de débris et en état d'imbibition oedémateuse, remplissent le neuroplasme .

Les altérations dégénératives intéressent les axones : au niveau des gaines myéliniques, il y a disparition de la lamination normale. Les axones englobent souvent des corps denses, des mytochondries altérées, gonflées, à crêtes rompues. Une dilatation des sacs présynaptiques s'accompagne d'une raréfaction des vésicules..

Les structures tubulaires intranucléaires ressemblant aux nucléocapsides de paramyxovirus semblent assez spécifiques de la LESS; elles n'ont été rencontrées jusqu'à présent dans aucune autre affection nerveuse. Elles sont observées quelle que soit la durée de la maladie, il n'existe donc pas au niveau du tissu nerveux dans la LESS d'autostérilisation virale.

III. MISE EN EVIDENCE D'UN ANTIGENE DE LA ROUGEOLE

C'est Connolly [6] qui a montré le premier la présence d'antigènes de rougeole dans les inclusions du cytoplasme de cellules nerveuses à l'aide de la fluorescence directe. Il a travaillé avec du sérum de malades atteints de LESS et du sérum de convalescents de rougeole, préalablement absorbés sur cellules Hep 2. L'antigène est visible dans quelques neurones du cortex frontal et temporal. . Des masses fluorescentes ovales entourées d'un anneau de granules fluorescents sont également visibles en grand nombre. Ces travaux ont été repris par Connolly l'année suivante à l'aide de sérum antimaladie de Carré [16], aucun antigène n'est alors démasqué.

La recherche de l'antigène par immunofluorescence ne peut cependant pas être faite communément pour le diagnostic. D'autant que ces résultats sont incertains car le nombre des cellules infectées est faible et la biopsie peut

fort bien intéresser une zone saine.

IV. LES SIGNES BIOLOGIQUES

Les anomalies biologiques rencontrées chez ces malades sont bien connues:

Dans le sérum, une augmentation du taux des alpha 2 globulines est fréquente (la moitié des cas); les gammaglobulines sont augmentées dans un quart des cas. Les phosphatases acides et les mucoprotéines sont souvent élevées.

Dans le LCR, les gammaglobulines représentent 40 à 50% des protéines totales. A l'immunoélectrophorèse, les immunoglobulines forment plusieurs arcs de précipitation à disposition oligoclonale.

C'est le travail de Connolly [6] en 1967 qui a attiré l'attention pour la première fois sur le taux des anticorps morbilleux chez les malades atteints de LESS. Depuis, de nombreux auteurs ont confirmé ces résultats. Cependant, peu d'études portant sur l'évolution des taux pendant le déroulement de la maladie ont été réalisés. Legg [17], en 1967, mène une enquête sur 22 malades, chez lesquels il ne met pas en évidence de montée d'anticorps significative au cours de la maladie. Un an plus tard, Connolly, qui suivait trois malades depuis plusieurs mois, rapporte une montée d'anticorps morbilleux considérable chez un de ses malades (16 fois), sans que cela corresponde à une augmentation concommittante des gammaglobulines sériques.

Le rapport $\frac{\text{sérum}}{\text{LCR}}$ pour les anticorps morbilleux est bas dans la LESS. Le rapport normal n'est pas connu, mais, chez des individus en bonne santé, il y a une relation constante entre le titre des anticorps antipolio dans le sérum et dans le LCR; la moyenne est de $\frac{505}{1}$.

Le taux d'anticorps sériques dans la LESS est égal ou supérieur à celui observé chez les convalescents de rougeole; mais les taux dans le LCR sont largement supérieurs à tous ceux qu'on peut observer ailleurs[18].

Les titres moyens calculés par Adels et Gajdusek[19] sont : pour le taux

sérique, en réaction de déviation du complément :

1/160ème, 33 fois,

1/80ème à 1/40ème, six fois,

1/20ème à 1/10ème, trois fois.

la moyenne géométrique étant de 211. Celle obtenue par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination est de 1.399. Dans le LCR, le titre moyen trouvé se situe entre 1/2 et 1/40ème.

Horta-Barbosa[18], après étude sérologique de 35 malades, a mis en évidence une différence significative entre les taux d'anticorps du stade initial et du stade de décérébration de la maladie, la différence allant dans le sens d'une augmentation des taux d'anticorps.

V. LESS ET VACCINATION

Plusieurs cas de LESS ont été décrits chez des enfants n'ayant jamais fait de rougeole clinique avant la vaccination. Deux cas sont rapportés par Parker[20] après vaccination par un vaccin atténué (souche Edmonston B). Les temps de latence entre la vaccination et le début de la maladie ont été respectivement de trois ans et de cinq mois.

Un cas est rapporté par Payne[21] avec une période d'incubation de un an.

Malheureusement, l'état immunitaire de tous ces malades avant la vaccination nous est inconnu, si bien qu'on ne peut dire s'il y a identité entre le virus atténué administré et le virus vu en microscopie électronique dans le cerveau des malades.

D'autre part, étant donné le petit nombre de cas décrits dans la littérature après vaccination et la faible incidence de la maladie dans la population en général, il est difficile de dire si les encéphalites sont plus fréquentes après vaccination par la souche atténuée ou après rougeole typique.

Chapitre IV

ETIOLOGIE ET PATHOGENIE

I. ISOLEMENT D'UN PARAMYXOVIRUS DU TISSU CEREBRAL

Toutes les tentatives pour isoler les paramyxovirus vus en microscopie électronique et caractérisés antigéniquement en immunofluorescence à partir de biopsie cérébrales de malades, se sont longtemps soldées par des échecs.

La première équipe à obtenir un effet cytopathogène in vitro fut celle de Baublis et Payne en Juin 1968[22]. Ces auteurs obtinrent, à partir de mise en culture de biopsies cérébrales, la formation de syncitium dans leurs cultures dès le 6ème jour, pour les flacons contenant des cellules cérébrales préalablement trypsinées. Ils n'obtinrent rien dans les flacons contenant des explants de cerveau. Les mêmes explants trypsinés trois semaines après et remis en culture dans de nouveaux flacons donnèrent des syncitiums dès le 5ème jour. De même les co-cultures de BSC et de cellules cérébrales trypsinées donnèrent naissance à des cellules géantes contenant l'antigène de rougeole. Le surnageant de ces cultures n'était pas infectieux.

Ainsi le traitement par la trypsine des cellules cérébrales paraît être important pour la formation du syncitium. Ces observations suggèrent que dans le cerveau et dans les cultures cellulaires de cerveau des anticorps[23], de l'interféron, ou tout autre inhibiteur, interfèrent directement ou indirectement avec la formation de syncitium. On a d'ailleurs démontré la présence d'interféron et d'inhibiteurs spécifiques du virus de la rougeole dans le cerveau des rongeurs infectés par la rougeole, et la présence d'anticorps antimorbilleux fixés sur les cellules cérébrales des malades atteints de LESS[54].

Quelques mois plus tard, le virus était enfin isolé simultanément dans

deux laboratoires par des techniques différentes.

a) Le laboratoire de Horta Barbosa[25] fit des cocultures de cellules cérébrales trypsinées et de cellules HeLa. Un effet cytopathogène apparut au bout de 5 jours. Le surnageant de ces cultures, inoculé à des cultures de HeLa provoque également l'apparition d'un effet cytopathogène, les cellules géantes formées hémadsorbant les hématies de singes rhésus. En même temps ces auteurs avaient cultivé des cellules cérébrales sans cellule indicatrice. Dans ces flacons-là ils n'observèrent aucun syncitium bien que des antigènes du virus morbilleux puissent y être détectés par immunofluorescence. De même le surnageant de ces cultures innoculé à des HeLa ne provoque aucun effet cytopathogène.

La co-culture est donc nécessaire à la production de particules virales infectieuses complètes.

b) Le laboratoire de Katz[26] de son côté isola le virus en cultivant des cellules cérébrales trypsinées et des cellules AGMK ou HeLa après avoir fait fusionner ces deux lignées entre elles. La fusion était obtenue grâce au virus Sendaï inactivé par la beta-propiolactone. Dans ces conditions l'effet cytopathogène apparaît du troisième au cinquième jour et la culture est entièrement détruite le douzième jour.

Les surnageants de culture sont infectieux.

Il ne semble pas que la fusion par le virus Sendaï soit réellement nécessaire dans tous les cas à la production virale puisqu'un troisième laboratoire, celui de Payne[27], isola le virus par coculture de cellules cérébrales - BSC sans fusion artificielle. Il est probable que les souches de LESS diffèrent dans leur degré de défectivité. Les premières études sur la structure et les propriétés du virus isolé ne révèlèrent pas de différence entre celui-ci et le virus de la rougeole. Il fallut des études plus poussées pour les mettre en évidence.

II. ETUDE DES CARACTERISTIQUES DU VIRUS ISOLE

a) Propriétés biologiques

La première étude approfondie des caractéristiques d'un virus isolé à partir d'une biopsie cérébrale d'un enfant atteint de LESS est due à Horta-Barbosa et Coll. (Mai 1970)[28]..

Ces auteurs ont entrepris de comparer systématiquement deux souches de LESS, une souche de virus de rougeole sauvage, et une souche de virus atténué, utilisé pour la vaccination.

1°) les virus de LESS ont été isolés à partir de cultures mixtes de cellules cérébrales et de HeLa, la suspension virale étant obtenue par congélation, décongélation brusque trois fois, centrifugation puis filtration sur millipore (0,45 et 0,8 millimu) pour éliminer les débris cellulaires.

2°) la souche de virus atténuée utilisée est la souche Edmonston, souche atténuée par 24 passages sur culture primaire de rein embryonnaire humain, 28 passages sur amnios humain, et 12 passages sur oeuf de poule embryonné suivi de 64 passages sur culture primaire d'embryon de poulet.

3°) la souche sauvage a été isolée de la gorge d'un enfant atteint de rougeole clinique et entretenue sur culture primaire de rein embryonnaire humain.

La comparaison de ces différentes souches porte sur l'activité cytolytique, le rendement en titre infectieux et en titre hémagglutinant. A cet effet, des flacons de cultures cellulaires ont été inoculés par une quantité connue de virus (1000 DCP 50 dans 5 ml). L'effet cytopathogène est noté au bout de 10 jours en pourcentage de destruction de la culture, puis les cultures sont congelées, décongelées deux fois, centrifugées et stockées à 4° pour titrage.

Les titres infectieux sont déterminés par titrage en tubes sur cellules AGMK (méthode de Reed et Muench), ainsi que par la méthode des plages sur BSC.

.Le titre hémagglutinant a été déterminé en microméthode avec des hématies

de singes Rhésus, après concentration 5 fois de l'antigène obtenu à partir de la culture sur AGMK. Les virus ont également été testés en neutralisation et en fixation de complément par des sérums de malades atteints de rougeole et de LESS, et des sérums de convalescents.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

Titre infectieux en DCP 50 (log 10)

Système cellulaire	souche sauvage	LESS	souche Edmonston
AGMK	4,2	6,2	4,2
BSC	2	7,2	2,4
HeLa	0	6,2	4,2
Ck	0	5,2	3,2
CE	0	4,2	3,2

Le virus de la LESS est celui qui donne les titres infectieux les plus élevés. Ce virus, comme le virus atténué, se révèle capable de se multiplier dans tous les systèmes cellulaires employés, alors que la souche sauvage ne se multiplie que sur BSC et AGMK.

En fait, il est connu qu'un virus isolé directement d'un malade se propage mieux en culture primaire de cellules de rein humain ou simien, ne devenant capable d'adaptation à d'autres systèmes cellulaires qu'après un certain nombre de passages. Le virus de la LESS a cependant un rendement en titre infectieux exceptionnellement élevé.

Titre hémagglutinant

Système cellulaire	souche sauvage	LESS	souche Edmonston
AGMK	0	8	0
BSC	0	8	0
HeLa	0	4	0
CK	0	0	0
CE	0	0	0

Il est remarquable que l'hémagglutinine ne soit produite que par la souche de LESS sur culture cellulaire de AGMK, BSC ou Hela.

Résultats des tests sérologiques en hémagglutination, fixation du complément et neutralisation

Antisérum	Virus atténué pour HI sauvage pour CF et Neu			Virus LESS		
	CF	HI	Neu	CF	Hi	Neu
LESS 1	2048	1024	256	1024	1024	64
2	1024	256	64	512	256	8
3	512	512		256	512	
4	1024	512		2048	1024	
5	1024	512		512	1024	
6	512	512		128	1024	
Rougeole 1	128	256	128	256	256	128
2	16	16		16	32	
3	32	64		32	64	32

En général, les sérums de malades atteints de LESS et ceux de convalescents de rougeole réagissent de la même façon, aussi bien contre l'antigène préparé à partir du virus de la LESS que du virus de rougeole en fixation du complément et en inhibition de l'hémagglutination. Mais les résultats diffèrent dans le test de neutralisation, les sérums de LESS ayant des titres en anticorps neutralisants 4 à 8 fois plus bas contre le virus de la LESS que contre la souche sauvage. Cette différence n'est pas retrouvée pour les sérums de convalescents. Ceci suggère que les anticorps produits par les malades atteints de LESS sont moins efficaces contre le virus de leur propre maladie que contre le virus sauvage.

Mais ce résultat est discuté par les autres auteurs.

Comparaison du titrage des 3 souches par la méthode des plages

Souche	Taille moyenne des plages (mm)	PFU par ml (log 10)
LESS	1,0	5,4
Vaccine	1,0	3,1
Sauvage	1,6	1,7

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Rapp en ce qui concerne la souche sauvage et la souche atténuée. Le haut titre en PFU de la souche LESS est à rapprocher du titre obtenu par la méthode des tubes. Il faut noter la différence remarquable dans la taille des plages entre le virus de la LESS et le virus sauvage et, en revanche, la ressemblance entre LESS et souche atténuée. La comparaison de plusieurs souches de LESS entre elles n'a pas montré de différences in vitro.

Une étude similaire a été faite par V. Ter Meulen[24] qui a comparé deux souches isolées (LEC... et JAC...) à une souche sauvage et une souche atténuée (Woodfolk et Edmonston). Les résultats qu'il a obtenus ne vont pas dans le même sens que ceux de Horta-Barbosa. En effet, les virus de LESS isolés par Ter Meulen poussent plus lentement, en culture cellulaire, que le virus sauvage ou atténué : les cellules infectées par la souche sauvage et atténuée commencent à produire un virus infectieux en 48 h. Le pic de concentration est atteint à la 96ème heure. A l'opposé les cellules infectées par les virus de LESS ne produisent pas de virus infectieux avant 72 heures et le pic est atteint à la 120ème heure.

Ter Meulen a suivi la cinétique d'apparition des antigènes dans les cellules à l'aide des techniques d'immunofluorescence indirecte.

24 heures après l'infection, un antigène cytoplasmique apparaît dans les lignées cellulaires quelle que soit la souche infectante, alors qu'un antigène nucléaire apparaît 48 heures après l'infection par le virus de la LESS, 96 heures après l'infection par le virus sauvage, et n'apparaît pas après infection par la souche atténuée.

L'observation d'une fluorescence intranucléaire dépend aussi du type de sérum utilisé pour la détection de l'antigène. Seuls les sérums de convalescents précoces et les sérums de LESS permettent de déceler l'antigène intranucléaire, alors que les sérums de convalescents tardifs et les sérums de lapin immunisé avec des virus de rougeole traités par le tween éther ne

le permettent pas.

Il y a donc une différence absolue entre les sérums de LESS et les sérums de convalescents tardifs.

Une autre différence frappante entre le virus de la LESS et le virus de la rougeole réside dans la différence de sensibilité des cellules transformées par le SV_{40} à ces deux virus : les cellules transformées résistent à l'infection par le virus de la LESS mais non au virus de la rougeole. On peut penser[24] que la résistance à l'infection par le virus de la LESS est liée à une faible pénétration; on a d'ailleurs montré que les cellules transformées ont une surface hautement modifiée. Cette hypothèse est étayée par l'observation que, contrairement au virus de la rougeole, les virus de la LESS, après une adsorption initiale sur les cellules, semblent être relâchés dans le milieu.

b) Etude structurale approfondie

Une étude approfondie de la structure en microscopie électronique des virus de rougeole et de LESS a été entreprise par Oyanagi et coll. (Janvier 1971)[29].

La lignée cellulaire utilisée pour l'infection et la production virale a été la lignée continue CV1, dérivée de cellules de rein de singes verts africains.

Les souches virales étaient d'une part un virus sauvage isolé de la gorge d'un malade, d'autre part la souche Edmonston et enfin deux souches de LESS, isolées de biopsies cérébrales.

1. Ultrastructure des cellules infectées par le virus de la LESS :

Résultats : ultrastructurellement les cellules infectées par l'une et l'autre souche de LESS ne diffèrent pas. La modification structurale essentielle réside dans la présence d'agrégats de structures filamenteuses dans le noyau de ces cellules; ces agrégats sont importants, occupant presque tout le no-

yau, avec des zones où les filaments sont orientés parallèlement, respectant toutefois la région sous-membranaire et les alentours du nuléole. Ce type d'agrégats correspond certainement aux "inclusions" typiques de la maladie. Dans d'autres cas, ces agrégats apparaissent comme de petits paquets enchevêtrés de 2 à 3 nanomètres de diamètre, dispersés dans un nucléoplasme par ailleurs normal.

A un plus fort grossissement, ces structures paraissent creuses, avec un diamètre externe de 15 à 17 nanomètres et un diamètre interne de 5 à 7 millimus. La longueur moyenne de ces filaments est de 300 millimus.

Nous appellerons ces filaments "filaments lisses".

Le cytoplasme de ces cellules contient également des structures filamenteuses d'aspect différent, essentiellement tubulaires, avec ou sans fines granulations à leur surface, granulations leur donnant un aspect flou.

Parfois ces structures sont associées aux ribosomes et aux réticulomes endoplasmiques comme si elles en dérivaient. Leur taille est de 20 à 25 millimus. On ne les rencontre jamais dans le noyau et elles ne sont jamais disposées en rang comme les filaments lisses. Nous les appellerons "filaments granuleux".

Ces filaments occupent une vaste surface du cytoplasme, prédominant dans la zone périnucléaire, respectant toujours la zone immédiatement située sous la membrane cellulaire. Ils n'ont jamais été observés alignés le long de la membrane cellulaire, comme c'est le cas dans les cellules infectées par le virus de la rougeole.

De petites ondulations ont été observées le long de la membrane, ainsi que de nombreuses particules rondes, libres à la surface des ondulations, comme si elles avaient été formées par bourgeonnement du cytoplasme.

Le contenu de ces particules semble le même que celui du cytoplasme. Elles ne sont pas constituées de nucléocapsides, mais d'une substance fibrillaire. On n'a jamais vu de particules complètes ressemblant au virus de la rougeole.

2. Ultrastructure des cellules infectées par le virus sauvage.

Les cellules infectées par le virus sauvage contiennent, dans quelques noyaux, des aggrégats de filaments lisses du même type que ceux vus dans les foyers d'enchevêtrement des cellules infectées par le virus de la LESS; mais il n'a jamais été vu de filaments lisses que nous avons décrits comme réalisant les inclusions typiques de la maladie. Pris individuellement, les filaments ont pourtant exactement le même aspect. Dans le cytoplasme, coexistent des filaments granuleux et des filaments lisses, que le noyau contienne ou non des filaments lisses.

Ils sont largement distribués dans tout le cytoplasme, mais, à l'opposé des cellules infectées par la LESS, ils prédominent sous la membrane cellulaire. Dans quelques segments ils sont alignés de façon parallèle sous celle-ci qui apparaît épaissie. De plus, à la surface de ces portions altérées, existent de petites excroissances pointant vers l'extérieur, contenant des particules virales.

Des particules libres à la surface de la cellule ont une membrane limitante du même type que la membrane altérée de la cellule avec des filaments granuleux alignés le long de celle-ci.

3. Ultrastructure des cellules infectées par le virus atténué.

Les cellules infectées par le virus atténué ont un cytoplasme identique à celui des cellules infectées par le virus sauvage. Cependant, leurs noyaux ne contiennent pas de filaments et apparaissent inchangés. Les lésions sont toutefois moins intenses que dans l'infection par le virus sauvage.

En résumé, les deux types de virus, virus sauvage et virus de la LESS produisent deux types d'éléments structuraux : des filaments lisses de 15 à 17 nanomètres de diamètre, et des filaments granuleux de 22 à 25 nanomètres qui ne diffèrent pas en apparence d'une souche à l'autre. Les différences sont cependant d'ordre quantitatif.

La formation de grandes inclusions intranucléaires contenant des filaments

lisses semble être une caractéristique du tissu cérébral dans la LESS, des cultures cellulaires de cerveau, et des cellules infectées par le virus isolé de la LESS.,

III. ISOLEMENT D'UN PARAMYXOVIRUS D'AUTRES TISSUS QUE LE TISSU CEREBRAL

a) Isolement d'un agent viral à partir de ganglions lymphatiques.

Outre du système nerveux central, un paramyxovirus a été isolé en Août 1971 par Horta-Barbosa et coll., de cultures mixtes de cellules de ganglion lymphatique et de cellules HeLa [30].

L'étude a porté sur 5 malades atteints de LESS à qui on avait effectué une biopsie ganglionnaire. L'isolement a été positif chez 2 de ces 5 malades.

Technique :

La biopsie, après trois jours de culture, donne naissance à un tapis cellulaire fait de deux types de cellules : des lymphocytes et des fibroblastes. Dans ces cellules on n'observe ni effet cytopathogène ni inclusions, ni morphologie anormale après coloration par l'hématoxyline, ni l'éosine. En fait, si les cellules fibroblastiques forment une coucha monocellulaire adhérant au flacon de culture, les fibroblastes restent libres dans le milieu. C'est eux qui sont recueillis pour mise en culture avec des cellules HeLa. La coculture est réalisée avec une proportion de 1 lymphocyte pour 5 HeLa et un total de 100.000 cellules par ml.

Résultats :

L'effet cytopathogène apparaît au bout de trois jours, le tapis cellulaire hémadsorbant alors les hématies de singe Rhésus, le surnageant de culture également. Cette activité hémadsorbante est inhibée par des dilutions en série de sérum de malades atteints de LESS et sérum de convalescents de rougeole, mais non par le sérum des mêmes malades prélevé au premier stade de la rougeole clinique.

Le passage en série de l'infection est possible en inoculant à des cellules HeLa soit du surnageant de coculture, soit des extraits cellulaires. L'effet cytopathogène est alors manifeste dès le second jour, les titres infectieux obtenus étant très élevés, de l'ordre de 10^8 par ml.

Le virus isolé passe à travers des filtres de 0,45 millimus de diamètre, mais est retenu en grande partie par des filtres de 0,22 millimus..

L'examen en microscopie électronique de tissus ganglionnaires des deux malades chez qui le virus a été isolé montre la présence, dans tous les ganglions, de structures filamenteuses intracytoplasmiques.

Il est remarquable que les deux malades chez qui l'isolement a été possible étaient tous les deux à un stade précoce de la maladie alors que les trois autres étaient à un stade tardif.

L'hypothése que l'on peut formuler à partir de ces résultats est que le virus persiste dans les cellules pendant la période d'incubation de la LESS en vertu d'une déficience spécifique de l'immunité cellulaire, soit congénitale, soit induite par le virus. Les cellules ganglionnaires porteuses d'un virus pourraient éventuellement migrer à partir des ganglions lymphatiques et initier la phase neurologique de la maladie lorsqu'elles atteindraient le système nerveux central.

b) Tentative d'isolement à partir des leucocytes du sang périphérique.

Nous-mêmes avons essayé d'isoler un agent infectieux les leucocytes atteints de LESS ou à défaut, de mettre en évidence la présence d'antigènes de rougeole dans ces leucocytes.

Technique :

Nous avons travaillé à partir de sang recueilli sur citrate. Le sang, additionné de 25% de dextran, est décanté pendant une heure; le plasma recueilli est centrifugé à 1500 tours pendant 5 minutes; le culot est mis en

coculture dans du milieu MEM 0,111 supplémenté en sérum de veau

- d'une part avec des cellules KB à raison de 5.000.000 de globules blancs pour 1.000.000 de KB;
- d'autre part avec des cellules BSC à raison de 10.000.000 de globules blancs pour 600.000 de BSC.

Au bout de 5 jours, le surnageant est récolté et les cultures dédoublées après trypsination. 5 jours après, nouvelle trypsination : la moitié des cellules sont remises en culture, l'autre moitié congelée à -80° C, décongelée brusquement, cela trois fois, et après centrifugation à 3.500 tours/minute pendant 3 minutes pour éliminer les débris cellulaires, inoculée à de nouveaux flacons de culture de BSC et de KB..

Résultats :

Les cultures ont ainsi été surveillées pendant un mois sans qu'il apparaisse d'effet cytopathogène.

Nous avons cherché à mettre en évidence l'antigène de rougeole par hémadsorption dans les flacons de culture sans aucun succès. Nous avons également titré le pouvoir hémagglutinant des surnageants de culture; il a été constamment nul.

Parallèlement nous avons essayé de mettre en évidence l'antigène de rougeole dans les globules blancs par immunofluorescence indirecte.

Méthode :

Pour cela, le culot de centrifugation du plasma recueilli après décantation du sang citraté, est étalé sur des lamelles après que les leucocytes aient été lavés trois fois dans l'alsever.

La lamelle étant sèche, elle est plongée dans un tube d'acétone dans la glace pendant 5 minutes, puis le tube d'acétone est porté dans un bac d'eau à température ambiante pendant 3 minutes.

La lamelle est alors sortie, séchée, colorée immédiatement ou stockée à -80° C.

Pour la coloration, les lamelles sont mouillées avec du PBS et disposées dans les boîtes de Pétri, posées sur des allumettes. On dispose alors à la surface de la lamelle une dilution adéquate de sérum humain en prenant soin de mouiller les bords.

On remet alors le couvercle de la boîte dans laquelle on a disposé un papier joseph mouillé pour que la lamelle ne risque pas de sécher et on porte la boîte une heure à 37° C.

On lave alors la lamelle trois fois dans du PBS, on l'égoutte, puis on la remet dans sa boîte et on la recouvre de sérum de lapin fluorescent anti-globuline humaine (Institut Pasteur).

On porte à nouveau la boîte 30 minutes à 37° C. La lamelle est à nouveau lavée 3 fois avec du PBS, puis montée sur une lame dans l'elvanol. Il faut la laisser durcir 20 minutes à 37° C.

Les lames sont ainsi prêtes à l'examen en microscopie optique à fluorescence, elles peuvent également être stockées à -20° C.

Matériel biologique utilisé :

1°) Nous avons ainsi fixé, coloré et examiné les globules blancs de 4 malades : REN.., CHA.., DEL.. et MET.. et de deux témoins fournis par la banque de sang de l'hopital Saint-Vincent-de-Paul.

2°) Les sérums utilisés étaient d'une part les sérums de malades ci-dessus cités, d'autre part deux sérums d'enfants ayant eu deux prélèvements sérologiques à 2 semaines d'intervalle, l'un inférieur au 1/4, l'autre franchement positif en inhibition de l'hémagglutination pour la rougeole (1/64ème et 1/128ème). Les sérums ont été filtrés sur millipores 0,22 millimu.

Nous avons fait une gamme de colorations de cultures de BSC infectées

par une souche sauvage de rougeole pour connaître la dilution du sérum et du conjugué donnant les images les plus nettes.

Nous avons ainsi été amenés à utiliser les sérums dilués à 1/16ème et le conjugué dilué au 1/20ème.

Résultats :

GLOBULES BLANCS	SERUM + de CONVALESCENT	SERUM NEGATIF	SERUM DE LESS
CHA..	-	-	-
REN..	Fluorescence intracytoplasmique	-	Fluorescence intracytoplasmique
DEL..	-	-	-
MEL..	-	-	-
Tém. n° 1	-	-	-
Tém. n° 2	-	-	-
BSC infecté par la rougeole	Fluorescence intracytoplasmique et intranucléaire	-	Fluorescence intracytoplasmique et intranucléaire

Chez un seul des quatre malades, nous avons observé une fluorescence intracytoplasmique diffuse dans un leucocyte sur 20 environ, les témoins n'étant pas fluorescents du tout*.

C) Anomalies chromosomiques des leucocytes de malades atteints de LESS

Une étude portant sur 6 malades du caryotype des leucocytes a été faite par Szirtes[31]. Outre les 6 malades, 3 témoins sains, un enfant atteint de rougeole typique et des leucocytes infectés in vitro par la rougeole ont été examinés.

Toutes les cultures de leucocytes de LESS ont montré des altérations.

---

* Ce résultat est contesté par Monsieur le professeur CHANY qui doute de la spécificité de la fluorescence observée.

Ces altérations sont de deux types :

- d'une part des ruptures chromosomiques,

- d'autre part un état très semblable à celui décrit par plusieurs auteurs comme étant "pulvérisation induite par un virus"[32]. La proportion entre ces deux types d'anomalies varie suivant les malades.

Les cultures de leucocytes infectées in vitro présentent les mêmes altérations que les leucocytes de LESS, ainsi que les leucocytes de l'enfant atteint de rougeole typique.

Les cultures de témoins sains sont indemnes de toute anomalie. Il est raisonnable de conclure, à la vue de ces résultats et en pensant au titre élevé en immunoglobuline circulante, que le virus de la rougeole persiste dans des cellules de type macrophage.

IV. ISOLEMENT D'UN SECOND VIRUS

Des particules d'un type de symétrie différente sans membrane, ont été vues en microscope électronique [33] dans le cytoplasme d'une culture de cerveau de LESS et dans des cellules AGMK infectées par un agent isolé de deux autres cultures de cerveau. En morphologie et taille, ces particules ressemblent à un papova virus. Les gradients de centrifugations d'homogénats de cellules montrent la présence d'un pic 20 S correspondant à la vitesse de sédimentation du DNA circulaire des virus Papova connus.

Les Papova Virus :

Les virus groupés sous cette dénomination sont caractérisés par un acide nucléique de type DNA, une capside nue, sans enveloppe, symétrie cubique et 42 capsomères. Ces virus déterminent des tumeurs, essentiellement chez l'animal. Les principaux représentants de ce groupe sont :

- le virus du papillome de Shope du lapin
- le virus du papillome humain (verrue)
- le virus polyoma de la souris
- le virus SV 40.

Le DNA de ces virus semble être un des plus petits connu chez les virus animaux. Son poids moléculaire est de 3 à 4 daltongrammes. La composition en bases G + C varie de 41% pour le SV 40 à 49% pour le polyoma, ces valeurs encadrant celles du DNA des cellules humaines (42 - 44 %).

Ceci n'est peut-être pas sans relations avec la propriété tumorigène des papova virus. Leur DNA est à double chaîne circulaire; il est infectieux par lui-même. Les DNA des virus polyoma, du papillome de Shope et du virus SV 40 peuvent même transformer les cellules qu'ils infectent en cellules malignes.

Les cellules cérébrales contenant ces particules ne possèdent pas d'antigène T ou VP du virus SV 40 détectable par la technique d'immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti SV 40. Ces particules n'ont été vues que dans les cellules syncitiales.

Elles ne passent pas dans le surnageant et ne se transmettent pas à des subcultures si ce n'est que lorsque le virus de la rougeole est aussi présent.

Lors de la reproduction de la maladie expérimentale chez le furet, le virus papova a été vu dans les cerveaux de furets infectés.

Outre que ce virus a été vu, on peut citer comme autre argument en faveur de son existence la capacité qu'ont les cellules cérébrales de malades à se transformer. Comme modèle de transformation, nous connaissons la transformation par le SV 40. On sait en effet que l'infection par le SV 40 est capable de convertir des cellules humaines en lignée continue.

La transformation est un processus triphasique : les changements précoces sont caractérisés par une croissance désorganisée, tumorale, avec une activité mitotique augmentée et une perte de l'inhibition de contact. Ils sont suivis d'une phase dégénérative pendant laquelle un grand nombre de cellules disparaissent. C'est ce que l'on appelle le "stade critique". Pendant la phase finale de transformation, le petit nombre de colonies ayant survécu à la crise prolifère et prend entièrement la place des fibroblastes d'origine.

Lors de l'observation de cultures de tissus cérébral de deux malades, Katz et coll. observa la formation de syncitium à partir du 14ème passage de la culture. Les cellules entrèrent alors dans une phase de latence qui dura 5 à 7 semaines, à la suite de laquelle les cellules commencèrent à se détacher. Deux semaines après, des colonies de cellules poussant activement apparurent. La culture à ce stade était pléomorphe et les caryotypes des cellules aneuploides, certaines cellules contenant 39 à 40 chromosomes, d'autres 72 à 80. Les chromosomes étaient altérés : chromosomes dicentriques, fragments acentriques, chromosomes en anneau...

Aucun antigène T de SV 40 n'a pu être décelé par fluorescence.

A partir de ce stade, la lignée cellulaire poussa activement, nécessitant un dédoublement tous les 5 jours environ.

On peut en conclure qu'il y a vraisemblablement un deuxième agent viral dans les cellules cérébrales de malades. Quelles hypothèses peut-on faire sur son rôle dans la pathogènese de la maladie ?

V. ETUDE DE L'ETAT IMMUNITAIRE DES MALADES ATTEINTS DE LESS

L'hypothèse d'une anomalie de la réponse immunitaire pour expliquer la pathogénie de la maladie a conduit de nombreux auteurs à étudier de façon

approfondie l'état immunitaire des malades.

Des tests de transformation blastique des lymphocytes[34] en présence de vaccins de rougeole atténués (Rouvax) préalablement tués, et en présence d'antigènes morbilleux fixant le complément ont été effectués chez 16 malades. Les réponses ont été négatives contrairement à ce qu'on attendrait d'enfants ayant eu une rougeole. Les réponses à la phytohémagglutinine étant normales, on peut conclure que ces enfants n'étaient pas immuno-déprimés.

Pour d'autres auteurs, les lymphocytes de malades atteints de LESS répondent à la stimulation par un antigène morbilleux de façon beaucoup plus forte que ceux de témoins ayant eu la rougeole.

Des tests de migration des leucocytes, que l'on sait corrélés à l'immunité de médiation cellulaire ont révélé une absence totale d'inhibition de migration.

L'inhibition est pourtant habituellement très franche chez les enfants ayant eu une rougeole démontrée.

Tout ceci évoque une tolérance partielle spécifique envers les antigènes morbilleux avec réponse humorale normale et réponse cellulaire déficitaire. L'absence d'hypersensibilité retardée contre ce virus pourrait expliquer sa survie prolongée à l'intérieur des cellules du malade[34]. Les résultats perdent beaucoup de leur sens quand on sait que 10% des témoins réagissent de la même façon.

D'autres auteurs ont soumis 4 enfants atteints de LESS à des tests cutanés contre 6 antigènes[35]. Ces malades n'ont manifesté aucune réponse retardée. Ils ont de même rejeté des greffes de peau allogéniques plus lentement que la normale et n'ont pas réussi à développer de sensibilité de contact au dinitrochlorobenzène.

Trois de ces quatre enfants n'avaient pas eu peu d'IgA. Les autres immu-

noglobulines étaient normales; les taux d'IgG dans le liquide céphalo-rachidien étant tous élevés et le rapport $\frac{\text{IgG}}{\text{protéines totales}}$ élevé également.

Après stimulation par des toxines diphtériques et tétaniques, leur réponse sérologique a été normale.

Le traitement des sérums par 2-mercaptoéthanol ne réduisant pas les titres après immunisation, ceci suggère que la grande majorité des anticorps mesurés sont des IgG.

Des sections colorées de ganglions lymphatiques régionaux prélevés postérieurement à la stimulation immunitaire par les toxines diphtériques et tétaniques montrèrent une concentration accrue de lymphocytes dans le cortex et la zone paracorticale, mais des centres germinaux rares et petits, contrairement à ce qu'on attend après avoir une stimulation antigénique.

Les lymphocytes du sang périphérique répondent normalement qualitativement, à une stimulation par la phytohémagglutinine. De même le taux de petits lymphocytes circulant est normal.

Chez ces 4 enfants, l'incidence des autres types d'infection était la même que dans la population générale.

Ce faisceau de découvertes suggère peut-être une petite anomalie fonctionnelle des lymphocytes thymodépendants.

Les données des études sérologiques et immunitaires permettent de faire plusieurs hypothèses :

1°) soit les enfants ont un défaut génétique de la réponse immunitaire qui les prédispose à la LESS

2°) soit le système immunitaire est bien modifié, mais la modification est induite par le virus de la rougeole,

3°) soit on est en présence d'un phénomène de déviation immunitaire avec réponse anticorps haute, mais pas de réponse cellulaire. En faveur de

de cette dernière hypothèse, nous pouvons donner le fait que la plupart des enfants atteints de LESS ont eu la rougeole très tôt avant l'âge de deux ans. Ceci est en accord avec des cas décrits après vaccination par vaccin atténué, vaccin qui donne principalement une immunité humorale.

4°) soit la réponse immunitaire est normale, mais les anticorps produits ne sont pas efficaces contre le virus. C'est l'avis de Saunders[36] qui pense que des lymphocytes, pourtant parfaitement capables de reconnaître l'antigène de la rougeole, ne le reconnaissaient plus sous sa forme "symbiotique".

Pour essayer de trancher entre ces différentes hypothèses, des études approfondies des immunoglobulines des malades ont été entreprises.

Dès 1964, on connaissait l'existence d'un composant protéique du LCR de LESS de migration lente en immunoélectrophorèse[37]. Ce composant fut appelé gamma c. C'est une globuline migrant vers la cathode qui est précipitée par les immuns sérums antigammaglobulines.

Cette globuline a été étudiée plus en détail par Bergmann. Elle s'est révélée être faite de plusieurs composants de faible poids moléculaire. Ceux-ci peuvent résulter soit d'une biosynthèse anormale des immunoglobulines du système nerveux central, soit de la dégradation des immunoglobulines par des enzymes protéolytiques anormalement actives. Rien ne permet encore de trancher entre ces deux hypothèses.

Par ailleurs, d'autres auteurs[38][39] ont étudié le comportement de sérums de malades en précipitation en gel contre l'antigène de la rougeole. Leur antigène était préparé à partir de cultures cellulaires de MK2 infectées par une souche sauvage. Les auteurs utilisèrent d'une part l'antigène des surnageants de cultures, d'autre part l'antigène intracellulaire obtenu en ultrasonnant les cellules. Les antigènes étaient concentrés par dyalise forcée.

? Leurs résultats sont très intéressants. On observe en effet chez 37 témoins convalescents de rougeole, un nombre de lignes de précipitation restreint, allant de 1 à 3, la troisième étant toujours très faible, visible seulement sur les photographies, alors que les 12 sérums de malades atteints de LESS forment entre 3 et 6 lignes de précipitation, aussi bien contre l'antigène surnageant que contre l'antigène cellulaire.

Le nombre de lignes indique en général soit le nombre de déterminants antigéniques, soit l'aggrégation d'antigènes de petite taille. Les antigènes décelés peuvent être des protéines structurales aussi bien que des protéines non structurales, spécifiques du virus, développées dans les cultures cellulaires pendant l'infection.

Les lignes supplémentaires observées avec le sérum de LESS peuvent être expliquées par le fait que, chez ces malades, pratiquement tous les antigènes morbilleux apparaissant au cours du cycle de réplication virale persistent des années dans l'organisme. Les malades sont donc hyperimmunisés vis-à-vis de ces antigènes.

VI. RECHERCHE D'UN EFFET "INTERFERON" DANS LE LCR DE MALADES ATTEINTS DE LESS

Nous avons cherché à mettre en évidence des quantités décelables d'interféron dans le LCR par un titrage biologique chez plusieurs malades.

a) MATERIEL

1°) Souches cellulaires

- a) cellules BSC

Ce sont des cellules épithéliales et fibroblastiques de rein de singe, cultivées en lignée continue, en milieu de Eagle, enrichies avec 10% de sérum de veau décomplémenté. Elles sont utilisées pour les titrages d'interféron humain. Ces titrages se font sur cultures en tubes à hémolyse

(12 mm/60 mm) ensemencées à raison de 60.000 cellules par millilitre et par tube.

- b) cellules L, souche 929 :

Les cellules L ont été isolées en 1943 à partir de souris mâles de 100 jours. Elles sont cultivées en flacon de Roux de un litre, à raison de 3.000.000 de cellules par flacon, dans du milieu de Eagle enrichi supplémenté en sérum de veau.

2°) Souches virales

- Le virus de la stomatite vésiculaire (souche Indiana).

La souche est entretenue par passages sur cellules L. Les cellules sont infectées avec une multiplicité de 10. Après lavage des cellules, la suspension virale est inoculée et la préparation incubée une heure à 37°C. Puis 40 ml de milieu de Eagle enrichi, sans sérum de veau, sont ajoutés à chaque flacon. L'effet cytopathogène est maximum en 48 heures à 37°C. Après congélations et décongélations successives la préparation est centrifugée à froid, dans une centrifugeuse "internationale" à 3.000 tours minute pendant 20 minutes. Le virus est conservé à -20° C et utilisé comme virus révélateur.

3°) Les milieux de culture

- a) le milieu essentiel minimum de Eagle (MEM 0,111) est utilisé pour la mise en culture et l'entretien des différentes espèces cellulaires.

- b) la solution saline équilibrée de Eagle est utilisée pour les dilutions de virus et la nutrition des cultures cellulaires pendant les titrages.

b) METHODES :

1°) Titrage du virus par la méthode des plages (Dulbecco 1952). Une suspension cellulaire de cellules L contenant 400.000 cellules par ml est ino-

culée dans des boîtes de Pétri en plastique (60/15 mm. Greiner ou Falcon) à raison de 5 ml par boîte, et incubée à 37° C en caissons étanches à CO_2.

Après 24 heures et avant l'inoculation, l'état de la couche monocellulaire confluente est observée à l'aide d'un microscope Leitz inversé. La suspension virale est diluée en progression logarithmique à base de 10, dans le milieu de Earle, et 0,5 ml de chaque dilution sont inoculés à deux boîtes de culture cellulaire.

Après une heure d'incubation à 37° C (temps d'adsorption du virus), la couche cellulaire est recouverte de 5 ml de gélose mélangée à parties égales avec du milieu de Eagle doublement enrichi, contenant des antibiotiques. Ce mélange est maintenu à 43° C et se solidifie après 10 minutes à température ambiante. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées dans des caissons à CO_2 et incubées à 37° C pendant 48 heures.

Au moment de la lecture, l'adjonction de rouge neutre à 0,01% facilite le comptage des plages. Le titre du virus calculé s'exprime en PFU (unité formatrice de plage).

2°) Titrage biologique de l'activité interféron des LCR.

L'activité biologique des LCR est déterminée par la propriété d'inhibition du rendement d'un virus révélateur.

Des tubes à hémolyse contenant 60,000 cellules BSC par tube sont incubées pendant 24 heures à 37° C. Le milieu est alors éliminé, les cellules lavées, avec 0,5 ml de milieu de Earle, et 0,50 ml de LCR introduit dans 5 tubes pour chaque dilution. Les dilutions utilisées ont été :

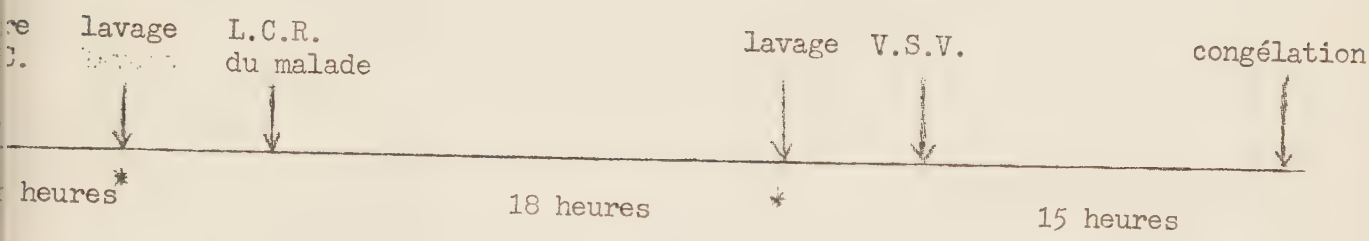
- pur
- 1/6
- 1/36
- 1/256ème

PLANCHE I

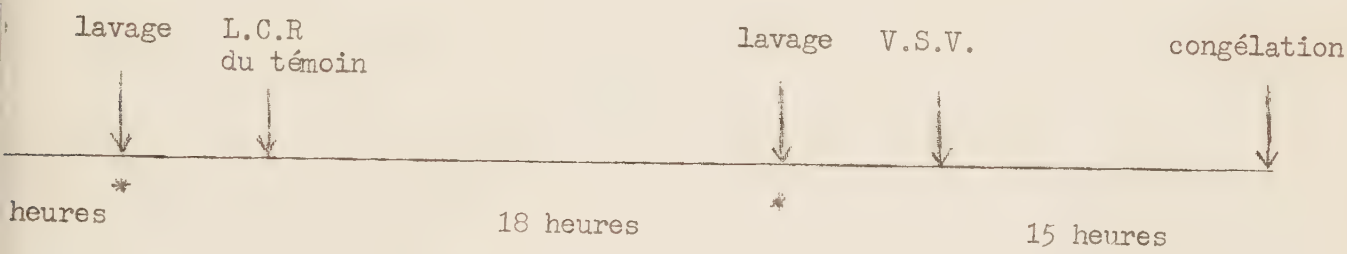
Protocole de titrage de l'effet du L.C.R.

sur la production virale.

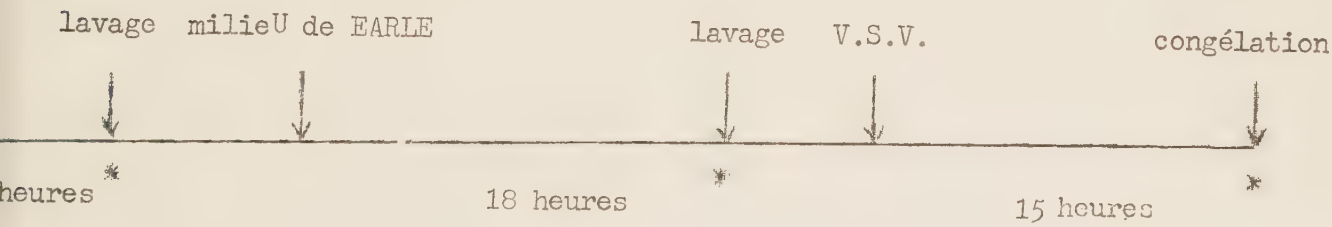
Itrage du L.C.R. témoin



trage du L.C.R. du témoin



trage du virus témoin



Pl. I

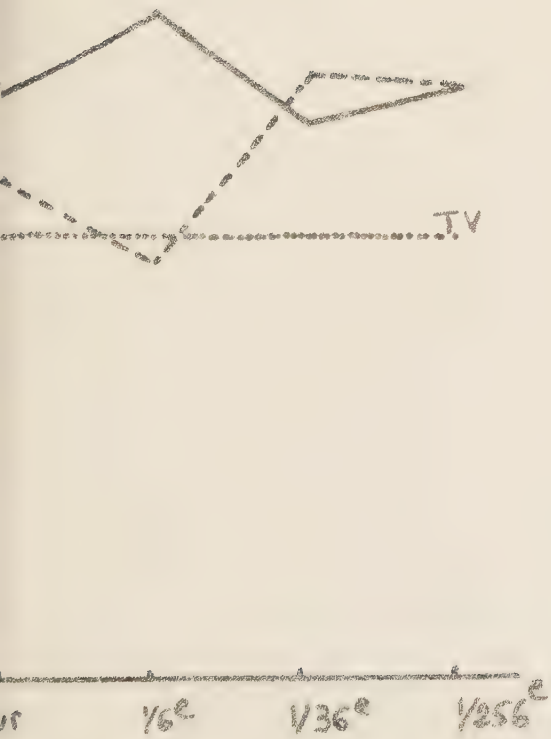
EFFET DU LCR SUR LA PRODUCTION VIRALE

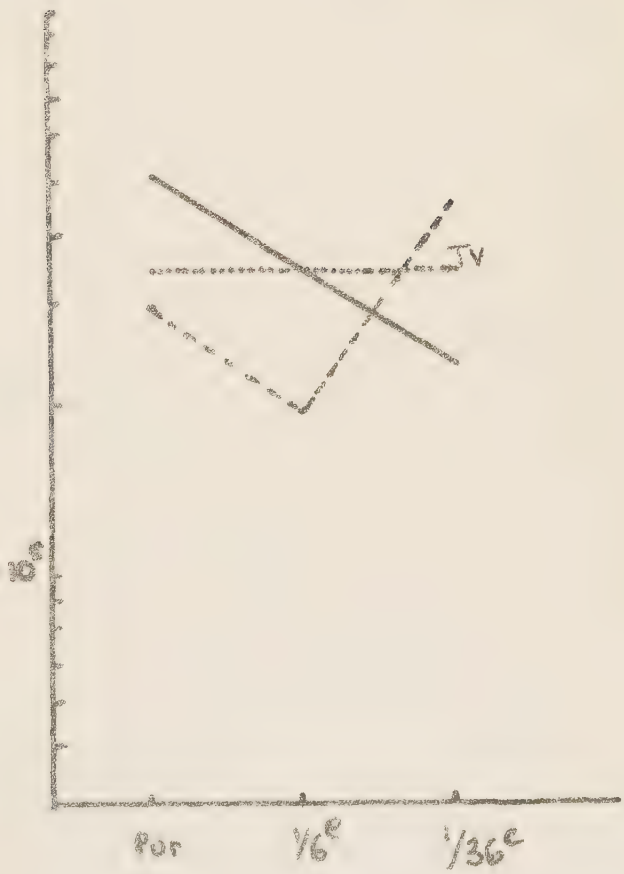
- - - - - LCR Témoin

———— LCR de malade

REN..

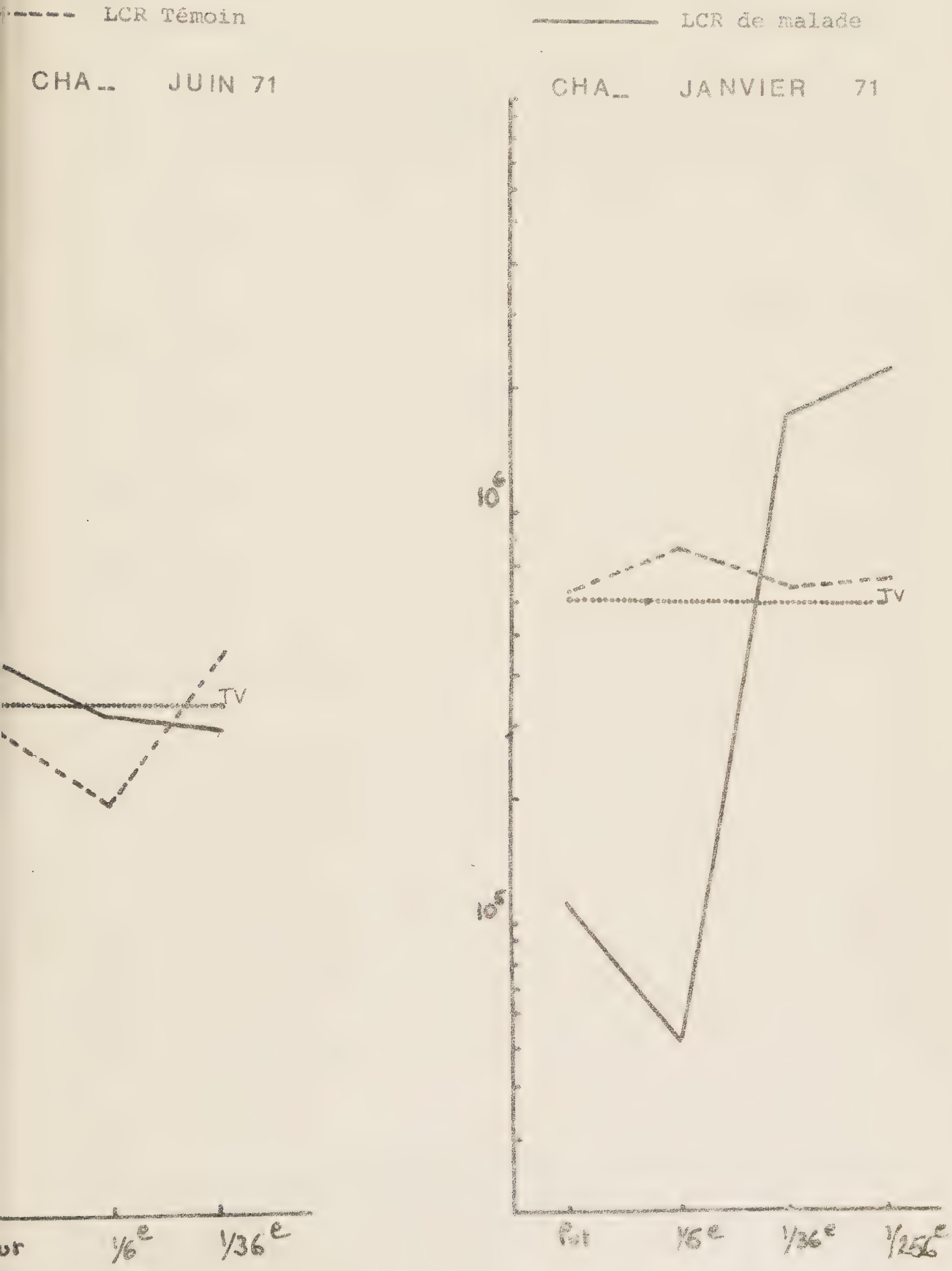
DEL..





Pl. 2

EFFET DU LCR SUR LA PRODUCTION VIRALE



Après 18 heures d'incubation à 37° C dans des caissons étanches, le LCR est éliminé et la couche cellulaire lavée une fois avec du Earle. Chaque tube est alors infecté avec le virus de la stomatite vésiculaire à raison de 60.000 PFU par tube, et mis à incuber pendant 15 heures. A ce terme; les tubes sont congelés à -80° C puis décongelés, les fractions de même dilution réunies et titrées par la méthode des plages décrite.

C) RESULTATS

Ce qu'on peut dire de ces résultats c'est que globalement le LCR a un effet activateur de la production virale et que les LCR de LESS ne contiennent pas de grandes quantités d'interféron, décelable par titrage biologique.

UN seul malade (Cha.. janvier) a provoqué une baisse du titre du virus produit notable, puisque de l'ordre d'un Log. 10.

Le LCR contient sans doute un très grand nombre de substances susceptibles d'agir sur la production virale. Celle que l'on a cherché à titrer n'a peut-être qu'une très faible activité complètement masquée par les nombreux activateurs présents.

VII. RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-INTERFERON DANS LES SERUMS DE MALADES ATTEINTS DE LESS

Nous avons pensé que dans les hypothèses pathogéniques possibles on pouvait citer la possibilité d'une anomalie immunitaire type "maladie auto-immune" avec présence d'anticorps anti-interféron. Nous avons ainsi cherché à en mettre en évidence dans le sérum des malades.

a) MATERIEL

- Tubes de culture cellulaire de BSC
- Virus VSV à un titre de 60.000 PFU par ml

- Milieu MEM 0,111 + antibiotiques
- Sérum de malade dilué au 1/4
- Interféron GB à 80 unités par ml.

Cet interféron est de l'interféron humain obtenu par infection de suspension de leucocytes humains par le virus NDV souche Hertfordshire à une multiplicité d'infection de 100. Le mélange est incubé à 37° C pendant trois heures sous agitation magnétique à 120 tours/minute. Les leucocytes infectés sont ensuite centrifugés et lavés une fois avec une solution d'alsever contenant 10% de sérum humain.

Le surnageant éliminé, contient le virus non adsorbé et les produits de lyse des hématies. Le culot de globules blancs est suspendu dans le milieu de Eagle contenant 5% de sérum humain, de telle façon que la concentration finale en leucocytes soit de 5.000.000 par ml. La suspension est incubée à 37° C dans des flacons de verre siliconés en respectant un rapport volumétrique entre la phase liquide et la phase gazeuse de 1/5ème. Après 22 heures, la suspension de globules blancs est centrifugée à 10.000 tours/minute à 4° C, le surnageant est traité à pH 2 pendant 5 jours, et le pH est ramené à 7,2.

Les préparations sont contrôlées et titrées biologiquement.

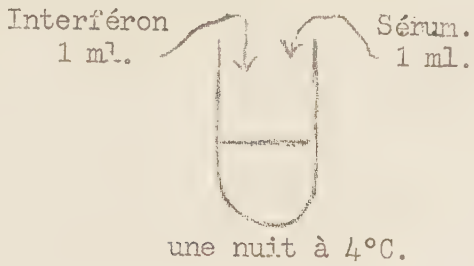
Le titre de l'interféron correspond à la dilution de virus où 50% de la couche cellulaire est protégé lors d'un titrage par tube à hémolyse. Le nombre d'unités protectrices d'interféron est défini par rapport à une référence interne du laboratoire du Professeur Chany, qui a été titrée par rapport à une référence internationale.

b) METHODES

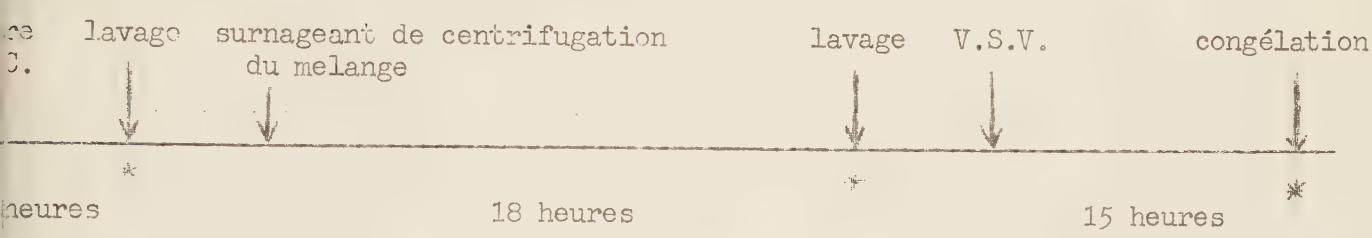
On met en présence 1 ml d'interféron et 1 ml de sérum dilué au 1/4 dans le MEM 0,111. Le mélange est porté une nuit à 4° C. Le lendemain, il

PLANCHE II

Protocole de la recherche d'anticorps anti-interféron



itrage du sérum de malade et de témoin



itrage de l'interféron témoin

itrage du virus témoin

est centrifugé 10 minutes à 4.000 tours minute, le surnageant recueilli est titré par la méthode décrite précédemment. Le titrage est réalisé pour les surnageants purs et dilués au cinquième.

c) RESULTATS

Titre du virus produit en PFU/ml

	serums	sérums + interféron
malades :		
REN..	$1,8.\ 10^5$	$3.\ 10^3$
CHA..	$2,5.\ 10^5$	$8,4.\ 10^3$
EMB..	$2,3.\ 10^5$	$4,8.\ 10^3$
DEL..	$2,8.\ 10^5$	$4,2.\ 10^3$
témoins :		
n°1	$2,4.\ 10^5$	$2,6.\ 10^3$
n°2	$8,5.\ 10^4$	$1,2.\ 10^3$
n°3	$1.\ 10^5$	$6.\ 10^3$
n° 4	$1,8\ 10^5$	$2,8\ 10^3$
témoin virus :	$8,4.\ 10^4$	
témoin interféron	$8.\ 10^2$	

L'interféron utilisé à 80 unités par ml fait baisser la production virale d'un facteur 100. Cet interféron, mis en présence de sérums 12 h. à 4° C, ne perd pas son activité antivirale.

Les sérums se comportent comme de légers activateurs de la production virale. L'addition de sérums et d'interféron aux cultures cellulaires provoque une baisse du titre d'un facteur 100 par rapport aux titres des cultures ayant reçu le sérum seul. Les résultats sont en tous points compa-

est centrifugé 10 minutes à 4.000 tours minute, le surnageant recueilli est titré par la méthode décrite précédemment. Le titrage est réalisé pour les surnageants purs et dilués au cinquième.

c) RESULTATS

Titre du virus produit en PFU/ml

	serums	sérums + interféron
malades :		
REN..	$1,8.\ 10^5$	$3.\ 10^3$
CHA..	$2,5.\ 10^5$	$8,4.\ 10^3$
EMB..	$2,3.\ 10^5$	$4,8.\ 10^3$
DEL..	$2,8.\ 10^5$	$4,2.\ 10^3$
témoins :		
n°1	$2,4.\ 10^5$	$2,6.\ 10^3$
n°2	$8,5.\ 10^4$	$1,2.\ 10^3$
n°3	$1.\ 10^5$	$6.\ 10^3$
n° 4	$1,8\ 10^5$	$2,8\ 10^3$
témoin virus :	$8,4.\ 10^4$	
témoin interféron	$8.\ 10^2$	

L'interféron utilisé à 80 unités par ml fait baisser la production virale d'un facteur 100. Cet interféron, mis en présence de sérums 12 h. à 4° C, ne perd pas son activité antivirale.

Les sérums se comportent comme de légers activateurs de la production virale. L'addition de sérums et d'interféron aux cultures cellulaires provoque une baisse du titre d'un facteur 100 par rapport aux titres des cultures ayant reçu le sérum seul. Les résultats sont en tous points compa-

rables chez les témoins et chez les malades.

Nous n'avons donc décelé aucun phénomène qui fasse penser à l'existence d'anticorps anti-interféron chez les malades atteints de LESS.

VIII. LA MALADIE EXPERIMENTALE

Une première publication de l'équipe de Katz[40] en 1968, fait état de la transmission d'un agent encéphalitogène à des furets par injections intracérébrales de suspension à 10% de tissu cérébral de trois malades atteints de LESS. Les animaux inoculés font une maladie neurologique, caractérisée par une ataxie et un désintérêt pour le monde extérieur, environ cinq mois après l'inoculation. L'examen des cerveaux de furets révèle une encéphalomyélite diffuse dont le tableau histologique comprend une prolifération gliale, des infiltrats périvasculaires; les lésions touchent indifféremment la substance blanche ou la substance grise, mais respectent toujours le cervelet.

L'inoculation de ces cerveaux de furets à d'autres furets reproduit une maladie plus sévère avec une période d'incubation plus courte, de l'ordre de 3 mois. Les signes électroencéphalographiques sont présents chez les furets bien avant l'apparition des signes cliniques.

Dans les deux années qui suivirent, l'isolement d'un agent infectieux de culture de cerveaux de malades atteints de LESS, permit de poursuivre les essais de reproduction de la maladie à l'animal en injectant des cellules cérébrales que l'on savait contenir une structure virale, et des cellules AGMK infectées avec cet agent isolé. Les résultats obtenus sont les mêmes dans les deux cas. Après inoculation de cerveau, les signes électriques apparaissent au bout de 20 semaines, alors qu'après inoculation de cellules

AGMK, les signes sont présents en une à deux semaines. Les signes cliniques sont alors beaucoup plus sévères.

Cette différence peut être attribuée aux plus petites quantités d'agent infectieux contenues dans le tissu cérébral que dans les cultures tissulaires, ou par la concentration plus élevée d'inhibiteurs, spécifiques ou non, qui peuvent avoir bloqué partiellement l'agent de la LESS dans le tissu cérébral.

Quoi qu'il en soit, les signes histologiques chez les furets et chez les malades sont les mêmes.

L'inoculation de surnageant de culture de AGMK contenant des particules virales libres, ne détermine pas d'encéphalomyélites. Cela n'est pas surprenant car on peut supposer que l'agent est fortement associé à la cellule comme l'indique le fait que son transfert d'un tissu à l'autre nécessite une coculture ou la fusion de deux systèmes cellulaires. A cet égard, l'agent de la LESS ressemble à un virus de rougeole adapté au cerveau de souriceau qui ne peut se propager dans les cultures de HeLa que si celles-ci sont inoculées par des cellules infectées et non par du surnageant de culture[41].

Après injection intramusculaire ou intrapéritonéale de souche Edmonston entretenue sur cellules HeLa, les furets ne développent aucune maladie.

Mais que les animaux soient inoculés avec des cellules de cerveau, des cellules AGMK infectées, des surnageants de culture ou des cellules HeLa infectées par la souche Edmonston, ils développent toujours des anticorps inhibant l'hémagglutination.

En 1970, une équipe à la recherche d'un animal d'expérience plus facile à élever et moins cher que le furet, montra que le hamster doré est également sensible au virus de la LESS[42].

L'inoculation intracérébrale de cocultures de biopsies cérébrales et de cellules CV1, après fusion, à des hamsters de 24 à 72 heures, détermine une encéphalite expérimentale de plus courte durée d'incubation que chez le furet. Histologiquement la maladie du hamster est une encéphalite aiguë visible seulement chez les animaux morts au moins 14 jours après l'inoculation.

Les mêmes animaux, inoculés de la même façon, par des cultures de CV1, infectées par une soucne Edmonston ne développent pas d'encéphalite, de même pour la souche sauvage.

Ainsi le virus de la LESS apparaît beaucoup plus pathogène pour le hamster que la souche sauvage ou la souche Edmonston. Ceci confirme l'observation de Waksman[43] qui rapporte que les hamsters sont réfractaires au virus de la rougeole, mais que la pathogénicité du virus pour ces animaux augmente après plusieurs passages aveugles.

Matumoto[44] fit des observations similaires dans son étude de l'infection rougeoleuse expérimentale chez la souris. Chez ces animaux, la maladie neurologique n'apparaît qu'après plusieurs passages successifs. Le virus qu'on peut isoler pousse plus difficilement en culture cellulaire et ne semble pas passer dans le milieu de culture surnageant des cellules.

La pathogénicité du virus de la LESS pour les hamsters nouveau-nés pourraît donc être le résultat de sa persistance prolongée dans le cerveau des malades; persistence qui aurait entraîné, ou qui serait la conséquence de la modification génétique de la souche.

Il faut quand même dire que les virus de LESS isolés ne sont pas tous pathogènes directement pour le hamster. Ainsi, dans le cas rapporté par Byington[45], un total de 4 passages alternés entre des hamsters et des

cultures de reins de singes était nécessaire pour que le virus devienne neurotrope.

Récemment, des essais de reproduction de la maladie chez le chien (Beagle) ont été faits. (24) Après une période d'incubation de 10 à 28 jours, les chiens développent une encéphalite aigüe avec décharges myocloniques, attaques épileptiformes, paralysie du train arrière et hypersalivation continuelle. Le virus peut être isolé du cerveau.

De même, des veaux et des agneaux ont été inoculés avec des cellules cérébrales de malades atteints de LESS. Après une période d'incubation de 23 à 44 jours, ils développent une encéphalite subaigüe. A l'autopsie on peut voir une panencéphalite diffuse et le virus peut être réisolé directement. Le fait remarquable est que les animaux ne fabriquent pas d'anticorps humoraux décelables, tandis que le groupe d'animaux témoins inoculé avec du virus de la rougeole ou du virus de la maladie de Carré développent des anticorps contre l'agent inoculé.

IX. HYPOTHESES PATHOGENIQUES.

Les hypothèses pathogéniques que l'on peut formuler pour tenter d'expliquer cette maladie à partir des connaissances actuelles sont nombreuses. Nous allons les shématiser à l'extrème afin de pouvoir aisément les discuter. La situation réelle est sans doute d'un tout autre ordre, beaucoup plus complexe, sortant même peut-être radicalement des concepts habituels.

I. Le virus de la rougeole est l'agent exclusif de la LESS

Dans cette hypothèse, plusieurs questions se posent :

I) Quand a-t-il pénétré dans le cerveau ?

- soit au moment de la primoinfection morbilleuse
- soit lors d'une réinfection.

2) Comment se fait-il que la maladie ne se déclare que chez certains enfants, avec une fréquence très faible ?

II. L'agent étiologique de la LESS est un virus apparenté à la rougeole.

I) Si cela est, en quoi diffèrent-ils ?

2) Ces différences sont elles des différences génétiques d'expression stable, ou des différences génétiques révélées au cours du développement de la maladie dans l'organisme ?

III. L'agent étiologique n'est pas le paramyxovirus exclusivement, mais un autre virus du groupe des papova, ou l'interaction de ces deux agents.

I) Peut-on dénier au paramyxovirus un rôle actif ?

2) Est-on sûr que le papovavirus est indispensable au développement de la maladie ?

3) Quel rôle peut jouer le papova virus ?

I. Le virus de la LESS est l'agent étiologique exclusif.

I) Dans cette hypothèse, quand a-t-il pénétré dans le cerveau ?

a) il peut y être entré au moment de la primoinfection morbilleuse. Il y resterait latent pendant des années avant d'être réactivé. Cette pathogénèse ressemblerait à ce que l'on décrit pour la varicelle et le zona chez l'homme, et à l'encéphalite différée obtenue expérimentalement chez le lapin par injection d'herpes simplex.

Un certain nombre de faits montrent que le SNC est touché pendant la rougeole habituelle [46]. Dans des cas non compliqués, Pampiglione [47] a découvert des anomalies de l'electroencéphalogramme chez tous les malades étudiés. Adams a montré que l'encéphalite morbilleuse aigue est

dans certains cas une encéphalite virale directe, puisqu'on trouve des inclusions typiques du virus de la rougeole dans le cerveau des malades.

La persistance très prolongée du virus dans le SNC est plausible quand on pense au travail de Enders-Ruckle [48] qui a réussi à isoler le virus de ganglions lymphatiques et de la rate plusieurs années après l'infection rougeoleuse. Si le virus penètre dans le cerveau, il pourrait donc s'y maintenir pendant des années de la même façon.

b) Le virus peut pénétrer dans le cerveau lors d'une réinfection. Il est généralement admis que l'immunité est de longue durée et les réinfections inexistantes ; mais ceci ne se base que sur le fait qu'une deuxième attaque avec exanthème est extrèmement rare. La réinfection pourrait fort bien être inapparente ; mais à notre avis, elle est très improbable car, pour que cette réinfection soit responsable de la maladie, il faudrait que le virus pénètre, non seulement dans le compartiment plasmatique mais aussi dans le cerveau. Cela ne semble possible qu'en cas de trouble de l'immunité de type humorale, avec, par exemple, absence d'Ig A spécifiques de la rougeole. Il n'a jamais été mis en évidence de taux anormalement bas d'Ig A chez les malades, globalement ; les Ig A spécifiques de la rougeole n'ont pas encore été étudiées.

2) Toujours dans l'hypothèse où le virus de la rougeole est l'agent étiologique exclusif, comment se fait-il que la maladie ne se déclare que chez certains enfants, avec une fréquence très faible ?

En effet, si on admet que le virus peut persister dans le cerveau pendant des années, peut-être de façon courante, il faut trouver une explication à sa subite reviviscence chez un très petit nombre d'individus. On ne peut alors qu'invoquer une prédisposition des malades à un tel évènement, et, en l'occurence, une anomalie congénitale de la réponse immunitaire. Cette hypothèse n'est guère plausible car tous les malades étudiés ont des réponses immunitaires qui ne sont perturbées

que vis-à-vis du virus de la rougeole ; une dissociation des réponses ne peut être le fait que d'une pathologie acquise. On ne connait, en effet, aucun trouble de la voie thymo-dépendante qui n'affecte pas toute l'immunité cellulaire. Or, dans la LESS, seule l'immunité cellulaire contre le virus de la rougeole semble perturbée. L'anomalie fonctionnelle dont parlent certains auteurs ne peut être elle-même qu'acquise, c'est-à-dire induite par un virus.

Il semble, cependant, que la période de latence entre la rougeole initiale et la LESS ne soit pas aussi silencieuse qu'on le pense habituellement : des auteurs ont pu mettre en évidence, a posteriori, une détérioration intellectuelle chez les futurs malades (56). Ainsi, la maladie débuterait dès l'infection initiale.

II. L'agent étiologique de la LESS est un virus apparenté à la rougeole. Dans cette hypothèse, en quoi diffèrent-ils ?

Nous avons vu qu'ils ne différaient pas dans leurs constituants fondamentaux visibles en microscopie électronique ; mais leur cycle intracellulaire dans les cellules cérébrales semble différent puisque dans la LESS on ne voit jamais de phénomène de bourgeonnement de la membrane ni de formation de virions complets. De plus, le cycle du virus de la LESS diffère du cycle du virus sauvage en ce qu'il n'est pas infectieux directement, mais nécessite pour pouvoir "passer" d'avoir été "démasqué" par coculture avec des cellules permissives. Il est probablement sous une forme partiellement réprimée dans les cerveaux.

Nous avons vu également qu'après leur isolement par coculture, les souches de LESS diffèrent de la souche de rougeole sauvage pour divers critères biologiques : taille des plages, aspect des cellules infectées en microscopie électronique, constituants antigéniques décelables en immunofluorescence, etc ... Conclure à une différence qualitative entre le virus de la LESS et le virus de la rougeole est difficile, car, en

matière de propriétés biologiques, les manipulations dont une souche virale a été l'objet ont une importance primordiale, or les souches comparées n'avaient pas toutes le même nombre de passages, n'avaient pas été isolées sur les mêmes cellules.

En concluant à la différence des souches, nous nous heurtons au problème de l'origine de cette différence.

a) Le virus de la LESS peut être un mutant de la rougeole particulièrement neurotrope. Les malades atteints de LESS ont généralement fait une rougeole tout à fait banale. Ceci va à l'encontre de l'hypothèse du neurotropisme primitif.

b) Le mutant neurotrope a pu être sélectionné au cours de la maladie. On peut postuler que l'infection primitive pourrait ne pas avorter, mais "couver" pendant des années, et que, sous la pression de l'immunité contre le virus de la rougeole, parfois un variant neurotrope serait sélectionné. Cette théorie est étayée par l'existence d'un clone de virus de LESS qui donne, en culture de tissu, deux types de plages (grande taille et petite taille) ; les virus isolés à partir des plages de petite taille sont neurotropes, ceux isolés à partir des plages de grande taille ne le sont pas [24].

c) Le virus de la rougeole est-il assez instable pour pouvoir acquérir dans le cerveau les propriétés que nous avons vu être celles du virus de la LESS ?

On sait que l'instabilité est une propriété assez générale du groupe des paramyxo, en particulier d'un de ses représentants : les virus de la maladie de Carré.

Jusqu'à quel point y a-t-il analogie entre virus de LESS et virus de la maladie de Carré ? Il existe une ressemblance frappante entre les lésions antomiques produites par ces deux virus, aussi bien en microscopie optique qu'électronique [5I]. Du point de vue antigénique, la

seule réaction croisée régulièrement observée est la présence d'anti corps anticarré chez l'homme infecté par la rougeole, l'inverse n'étant pas vrai car on n'a jamais pu obtenir l'immunisation d'enfants contre la rougeole au moyen du virus de Carré atténué. Le virus de Carré se montre plus ou moins dégradé par rapport au virus morbilleux qui se révèle "dominant". L'argument de l'assymétrie des propriétés antigéniques n'est pas suffisant pour affirmer que le virus de Carré n'est pas capable de se multiplier chez l'homme, d'autant qu'il se multiplie très bien in vitro dans les cellules humaines et qu'il est pathogène pour le singe (macaca sylvanus) (52). Plusieurs arguments plaident en faveur d'une relation entre virus de Carré et virus de LESS :

I) des données épidémiologiques : On retrouve souvent dans l'entourage des enfants la notion de chien mort de maladie mystérieuse quelques temps avant le début de la maladie. De même, la maladie est géographiquement plus fréquente dans les zones non urbaines à forte concentration de chiens (55).

2) des données sérologiques : les serums de LESS donnent un arc de précipitation contre un antigène du virus de la maladie de Carré (53), alors que les témoins n'en donnent pas. Il n'existe pas de parenté antigénique entre cet antigène précipitant et ceux du virus morbilleux, car l'arc de précipitation contre l'antigène de Carré s'entrecroise avec ceux de la rougeole, car un serum de LESS absorbé auparavant par l'antigène de rougeole conserve les anticorps précipitant l'antigène de Carré. Ces résultats laissent penser qu'une infection par le virus de la maladie de Carré peut contribuer au déclenchement du processus pathologique.

III. <u>Si l'agent étiologique exclusif n'est pas le paramyxovirus présent dans le cerveau des malades, peut-on incriminer le Papova virus mis en évidence par Barbanti-Brodano</u> ?

Il faut dire tout d'abord que le paramyxovirus ne peut être là par hasard. Un grand nombre de cerveaux de témoins ont été examinés sans que l'on observe jamais de nucléocapside évoquant la rougeole. De plus, les malades atteints de LESS ont des taux d'anticorps anti-rougeole significativement plus élevés que ceux de la population générale. Le virus de la rougeole fait donc forcément partie du processus responsable de la maladie.

La présence constante de Papova virus dans le cerveau de malades n'est pas encore une certitude ; des particules de ce type n'ont été vues que dans deux laboratoires alors que de nombreux autres ont examiné des cellules cérébrales de LESS sans jamais en observer. Si l'on se réfère à la publication de Barbanti-Brodano [26] et coll., on est obligé de penser que le papova virus joue un rôle actif dans la maladie puisqu'on le retrouve dans le cerveau des furets qui font la maladie expérimentale après injection de cellules cérébrales de malades.

Quel rôle peut jouer le Papova virus ?

On peut postuler que le Papova virus est capable de rester dans les cellules cérébrales sans être infectieux donc sans causer de signes pathologiques. La fusion cellulaire produite par un virus du groupe paramyxo rendrait le Papova virus capable de se propager. Quand un nombre suffisant de cellules seraient impliqué dans le processus, la maladie deviendrait manifeste. Ceci est à rapprocher de l'interaction entre le virus Sendaï et le virus SV 40. Le génome SV 40 peut être activé dans les cellules transformées seulement s'il passe dans d'autres types cellulaires grace à la fusion provoquée par des virions Sendaïnon infectieux. Cette hypothèse est l'hypothèse "mécaniste", la coopération entre les deux virus se faisant au niveau de la propagation de l'un grace aux fusions cellulaires provoquées par l'autre.

On peut émettre une autre hypothèse : le DNA du Papova virus activerait ou réactiverait le RNA du paramyxo à un niveau moléculaire. Dans cette hypothèse, le paramyxo pourrait infecter le cerveau de façon, peut-être, courante sans déterminer de maladie, et ce serait l'infection par un papova virus qui déclencherait la maladie.

Ceci expliquerait la variabilité très grande des temps de latence observés entre la rougeole initiale et la leucoencéphalite. Cette variabilité nous parait d'ailleurs être un argument assez fort contre l'hypothèse du paramyxovirus comme agent étiologique exclusif, car la période de latence devrait dans cette hypothèse tourner autour d'une période de latence chiffrable.

Ainsi des affections aigues de l'enfance telle la rougeole dans laquelle le cerveau est infecté plus souvent qu'on le suppose [49], peuvent conduire à la LESS si des cellules déjà infectées par le paramyxovirus étaient surinfectées par un Papova virus.

CONCLUSION

Le grand nombre de travaux entrepris dans le monde à partir de 1967, grâce à l'orientation étiologique décisive apportée par Connolly, a permis d'approfondir notre connaissance de la LESS, sans encore résoudre le problème de sa pathogénèse.

On connait maintenant un certain nombre de faits expérimentaux ou d'observations :

- La LESS est une panencéphalite d'individualité clinique, électroencéphalographique, et anatomique indiscutable. Elle survient plus souvent chez les garçons que chez les filles, quelques mois à quelques années après une rougeole initiale en apparence banale.

- Les individus atteints n'ont pas troubles immunologiques patents. Leur immunité humorale semble normale puisqu'ils possèdent des anticorps anti-rougeole à des taux élevés.

- Un paramyxovirus est impliqué dans le processus pathologique. Le virus peut être isolé des cellules cérébrales par coculture avec des cellules permissives. Il y a une parenté antigénique étroite entre le virus de la LESS et le virus de la rougeole, toutefois les souches isolées de LESS diffèrent des souches sauvages pour divers critères biologiques.

- Au moment de la maladie, le virus est présent dans d'autres tissus que le tissu cérébral, en particulier dans les ganglions lymphatiques. Certaines anomalies caryotypiques laissent supposer que le virus pourrait être présent dans des leucocytes du sang périphérique.

- Un second virus ressemblant à un Papova virus a été vu dans deux laboratoires.

- La LESS est reproductible par injection intracérébrale de tissu cérébral de malade à des furets et à des hamsters. Le virus de la LESS est plus pathogène pour ces animaux que le virus sauvage ou le virus attenué.

Le virus de la maladie de Carré est peut-être impliqué dans le développement de la LESS puisqu'on trouve dans le serum des malades des anticorps précipitants contre un antigène du virus de Carré, différent des antigènes morbilleux.

A partir de ces données, l'hypothèse qui nous parait vraisemblable est que virus de rougeole et virus de Carré sont tous deux impliqués dans la pathogénèse. Il peut s'agir soit de deux évènements rares : d'une part l'infection du tissu cérébral par le virus de la rougeole, d'autre part l'infection quelque temps plus tard par le virus de Carré, qui ne serait pas neutralisé par les anticorps anti-morbilleux ; soit d'un évènement unique : l'infection du cerveau par un recombinant entre le virus de la rougeole et celui de la maladie de Carré.

Ces deux hypothèses sont des hypothèses de travail qui nous paraissent justifiées par les données épidémiologiques.

Vu le président
R. BASTIN

Vu le doyen de la
Faculté Xavier Bichat
J. BAUMANN

Vu et permis d'imprimer
le recteur de l'Académie de Paris
R. MALLET

BIBLIOGRAPHIE

I. DAWSON J.R., Amer. J. Path., 9 : 7, (I933)

2. VAN BOGAERT L. and de BUSSCHER J., Rev. Neurol. (Paris), 7I:67 (I939)

3. GREENFIELD J.G., Greenfield's neuropathology, 2e ed., edited by W. Blackwood, Edward Arnold Publishers Ltd, London, p. 207 (I963)

4. RADERMECKER J., POSER C.M., World Neurology, I:422-433, (I960)

5. BOUTEILLE C. et coll., Rev. Neurol., II3:454-458, (I965)

6. CONNOLLY J.H. and al., Lancet, 542-544, (I967)

7. MEYER H.M. and al., J. Dis. Child., I03:307-3I3, (I962)

8. CELERS J., Arch. Ges. Virusforsch., I6:5-I8, (I965)

9. PAMPIGLIONE, British Medical Journal, 5, II, I296-I300, (I964)

I0. CATHALA F., Revue du Praticien, 2I, 5:673-69I, (1971)

II. BASTIN R., Maladies infectieuses, Flammarion Ed., Tome II:II0I-II35, (I97I)

I2. SAINT-MAUR Mme de, Thèse med. Paris (I967)

I3. PERIES J.R. et CHANY C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., II0:477, (I962)

I4. JABBOUR and al., J. of Amer. Med. Ass., 207:2248-2254, (I969)

I5. TOGA M. and al., Acta Neuropath., I4:I-I3, (I969)

I6. ADAMS, J. Amer. Med. Ass., I95:290, (I966)

I7. LEGG N.J., Brit. Med. J., 3:300, (I967)

I8. HORTA-BARBOSA L. and al., Pediatrics, Vol. 47 n° 4, (I97I)

I9. GIBBS C.J., Pediatric Research, 3:495-5I7, (I969)

20. PARKER J.C. and al., Amer. J. of Path., vol. 6I n°2, (I970)

2I. PAYNE F. and al., New Engl. J. Med., 28I:585-589, (I969)

22. BAUBLIS J.V. and al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., I29:593-597, (I968)

23. TOURTELOTTE et coll., Neurology, I8:II7, (I968)

24. TER MEULEN V., Communication, Ier Congrès Européen de virologie, 3 Mai I972

25. HORTA-BARBOSA L. and al., Nature, 221:974, (1969)

26. BARBANTI-BRODANO G. and al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Vol. 134 n°1:230-236, (1970)

27. PAYNE F.E. and al., New Engl. J. of Med., 281:585-589, (1969)

28. HORTA-BARBOSA and al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 134 n°1:17 (1970)

29. OYANAGI ;J. of Virol.,jan. 71, p.176-187.

30. HORTA-BARBOSA L. and al., Science, Vol. 173:840-841, (1971)

31. SZIRTES M. and al., Nature, Vol. 222, n°5194:692-693, (1969)

32. NICHOLS W.W. and al., Arch. Ges. Virusforsch.,16:168, (1965)

33. KATZ M. and al., Exp. Cell. Res., 57:149, (1969)

34. REINERT Ph. et coll., Presse médicale, p. 1687, (1971)

35. KENNETH L. and al., New Engl. J. Med., 285:78-82, (1971)

36. SAUNDRES M., Lancet, 1:72-74, (1969)

37. DENCKER, Acta Neurol. Scand., 40:57, (1964)

38. PANELIUS, Acta Path. Microbiol. Scand. Section B, 78:588-592 (1970)

39. PALOSNO and al., Arch. Ges. Virusforsch., 35:45-53, (1971)

40. KATZ M. and al., New Engl. J. of Med., 279:793-798, (1968)

41. IMAGAWA D.T. and al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98:567-569, (1958)

42. LEHRICH J.R. and al., Arch. Neurol., 23:97-102, (1970)

43. WAKSMAN and al., J. Neuropath. Exp. Neurol., 21:25, (1962)

44. MATUMOTO T. and al., Arch. Ges. Virusforsch., XIV, 5:683-696, (1964)

45. BURNSTEIN and BYINGTON, Neurology, 18:162, 1968)

46. SCHMIDT J.R. and al., J. of Infect. dis., 106:154, (1960)

47. PAMPIGLIONE, Brit. Med. J., 2:1296, (1964)

48. ENDERS-RUCKLE G., Arch. Ges. Virusforsch., 16:182, (1965)

49. GIBBS F.A. and al., J. Amer. Med. Ass., 171:1050, (1959)

50. SCHLUEDERBERG A., Bioch. Biophys. Research Comm. Vol. 42 n°6: 1012-1015, (1971)

51. GUILLON J.C. et coll., Bull. Acad. Vet., 43:293, (1970)

52. GORET P., Economie et Med. Anim., 25:329, (I96I)

53. LEBON P. et coll., CR. Acad. Sc. Paris, Série D, I757, (I972)

54. NORRBY E., Communication, Ier Congrès européen de virologie, 4 Mai I972

55. BRODY et DETELS, cité au congrès par TER MEULEN

56. PETTAY O. and al., J. of Infect. Dis., I24 n°5:439-444, (I97I)